

Renan Antonialli

**Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por
antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

São Paulo
2013

Renan Antonialli

**Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por
antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2**

Dissertação apresentada ao Programa Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof.^a Dr.^a Silvia Beatriz Boscardin

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Antonialli, Renan.

Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2 / Renan Antonialli. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Vacinas.

Versão do título para o inglês: Effect of Toll-like receptors ligands in the immune response induced by antigens targeted to DEC205 and DCIR2.

1. Malária 2. Vacinas 3. Immunologia I. Boscardin, Profa. Dra. Silvia Beatriz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0170/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renan Antonialli.

Título da Dissertação: Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.084/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 82/08/CEUA, datado de 26.08.2008 e por solicitação da Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Renan Antonialli** ao Projeto de Pesquisa "*Direcionamento de antígenos recombinantes para células dendríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 19 de janeiro de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

*À minha família, pela grande
dedicação e incentivo na minha
formação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Silvia Beatriz Boscardin, não apenas por tornar esse projeto possível, mas principalmente por ser um exemplo de extraordinária dedicação à ciência e grande generosidade.

Agradeço pelo apoio e companheirismo dos colegas Eline, Ícaro, Hugo, Kelly, Raquel, Hildener, Elaine e Tamara. Também aos conselhos e apoio técnico do Marcio Massao Yamamoto, que será sempre minha referência de profissionalismo.

Aos amigos Wesley, Mauricio e Mariana por converterem os “perrengues” da pós-graduação em rizadas.

Aos professores, Renato Barboza, Daniela Santoro Rosa, Claudio Roberto Marinho, Beatriz Stolf e Gerhard Wunderlich. Bem como aos membros de seus laboratórios. E também aos funcionários no Departamento de Parasitologia, principalmente à equipe do biotério: Sandra, Dani e Jú.

Aos amigos que fiz na graduação: Leonardo, Bruna, Rodrigo, Aline, Clarissa, Bento, Magna e Pará. E aos companheiros de república: Isinha, Lutero, Tiago Albuquerque, Matheus, Tiago Jatobá e Tarcio.

À inestimável dedicação da Prof.^a Lourdes Isaac, Dr.^a Maria Isabel Vendramini e Marlene Florido. Pessoas que foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Aos meus familiares, que nunca mediram esforços para me ajudar a realizar meus sonhos.

Aos órgãos e agências financiadores de pesquisa FAPES, Cnpq, CAPES e Banco PARIBAS.

RESUMO

ATONIALLI, Renan. **Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2.** 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As células dendríticas (DCs) são componentes do sistema imune capazes de ligar a imunidade inata à imunidade adquirida. Tais células expressam receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo capazes de capturar, processar e apresentar antígenos para os linfócitos. O contato com diferentes PAMPs induz a maturação das DCs, processo que se caracteriza pela expressão de moléculas co-estimuladoras e secreção de citocinas. Este processo é crítico para que as DCs possam ativar de forma eficiente linfócitos T e B. Nos últimos anos, uma estratégia que direciona antígenos para as DCs *in vivo* vem sendo utilizada com sucesso em modelos animais e testes clínicos visando o desenvolvimento de vacinas já estão sendo realizados. Esta estratégia consiste no uso de anticorpos monoclonais contra receptores endocíticos (por exemplo, DEC205 ou DCIR2) presentes nas superfícies de populações distintas de DCs em fusão com o antígeno de interesse. A administração de baixas doses destes anticorpos quiméricos é capaz de ativar células T antígeno-específicas e induzir a produção de anticorpos contra o antígeno. No entanto, a ativação efetiva do sistema imune ocorre principalmente quando os anticorpos quiméricos anti-DEC ou anti-DCIR2 são administrados na presença de um estímulo de maturação para as DCs. Entre as substâncias capazes de ativar as DCs estão ligantes de receptores semelhantes a Toll (TLRs), que se associam aos TLRs presentes na superfície ou dentro da célula. No baço e linfonodos de camundongos, as DCs podem ser divididas em diferentes populações pela análise de diversos marcadores expressos em sua superfície. Basicamente são encontradas 3 populações: DCs clássicas CD8 α ⁺DEC205⁺, DCs clássicas CD8 α ⁻ (que podem ou não expressar DCIR2) e DCs plasmocitoides. Diferentes combinações de TLRs são expressos nas duas populações de DC clássicas. A população CD8 α ⁺DEC205⁺ expressa todos os TLRs exceto TLR5 e TLR7, enquanto a população CD8 α ⁻DCIR2⁺ expressa principalmente os TLRs 1, 5, 6 e 7. Outros receptores também são sensíveis à agonistas de TLRs como o MDA5, que é da família das Helicases Semelhantes a RIG-1 (RLHs) e o NLCR4 que pertence à família dos receptores semelhantes a NOD (NLR). Neste trabalho nós avaliamos a contribuição dos ligantes de alguns TLRs na geração de uma resposta imune específica quando administrados conjuntamente com os anticorpos quiméricos que direcionam o antígeno para os receptores DEC205 ou DCIR2. Utilizamos poly I:C (ligante dos receptores TLR3 e MDA5), CpG ODN 1826 (ligante do receptor TLR9) e flagelina de *Salmonella typhimurium* (ligante dos receptores TLR5 e NLCR4). Imunizamos camundongos selvagens ou *knockouts* para os receptores TLR 3, 5 e 9 com adjuvantes e anticorpos quiméricos anti-DEC205, anti-DCIR2 ou isotipo controle (Iso) em fusão com a proteína MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* que contém em sua porção C-terminal um epítipo pan alélico (PADRE, pan allelic DR epitope) reconhecido por células T CD4⁺ de camundongos de haplótipo H-2^b. Após a administração de duas doses, avaliamos as repostas imunes humoral (títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉) e celular (produção de citocinas pró-inflamatórias e proliferação de células T CD4⁺ específicas) nos diferentes grupos imunizados. Nossos resultados indicam que, seja qual for o adjuvante usado, a maioria dos parâmetros analisados aponta para a superioridade do direcionamento do antígeno para o receptor DEC205.

Palavras-chave: Células Dendríticas. TLRs, vacinas. DEC205. DCIR2.

ABSTRACT

ATONIALLI, Renan. **Effect of Toll-like receptors ligands in the immune response induced by antigens targeted to DEC205 and DCIR2**. 2013. 63 p. Masters thesis (Biology of the Host-Pathogen Interaction) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Dendritic cells (DCs) are components of the immune system capable of linking innate and acquired immunity. Such cells express receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and are able to capture, process and present antigens to lymphocytes. Contact with different PAMPs induces DC maturation, a process that is characterized by the expression of costimulatory molecules and cytokine secretion. This process appears to be critical for DCs to efficiently activate T and B lymphocytes. In recent years, a strategy that directs antigens to DCs *in vivo* has been successfully employed in animal models, and clinical trials aimed at developing a vaccine are already underway. This strategy consists in the use of monoclonal antibodies against endocytic receptors (such as DEC205 and DCIR2, for example) present on the surface of distinct DC populations fused with the antigen of interest. The administration of low doses of these chimeric antibodies is able to activate antigen-specific T cells and also to induce antigen-specific antibody production. However, effective immune activation occurs mainly when the chimeric antibodies anti-DEC or anti-DCIR2 are administered in the presence of a DC maturation stimulus. Among the substances capable of activating DCs are ligands of the Toll-like receptors (TLRs), which associate to TLRs present in the surface or inside the cell. In the spleen and lymph nodes of mice, DCs can be divided in different populations by the analysis of surface markers. Basically, DCs are divided in three populations: classic DCs $CD8\alpha^+ DEC205^+$, classic DCs $CD8\alpha^-$ (which can or not express DCIR2) and plasmacytoid DCs. TLRs are expressed in different combinations on the two populations of classic DCs. The $CD8\alpha^+ DEC205^+$ DC population expresses all TLRs except TLR5 and TLR7, while the $CD8\alpha^- DCIR2^+$ population mainly expresses TLRs 1, 5, 6 and 7. Other receptors are also sensitive to TLR agonists, such as MDA5, which belongs to the Helicases RIG-1 (RLHs) family and the NLRC4 which belongs to the Nod-like receptor family (NLRs). In this work we evaluated the contribution of some TLR ligands in the generation of a specific immune response when administered together with chimeric antibodies that target the DEC205 or DCIR2 receptors. We used poly I:C (a TLR3 and MDA5 ligand), CpG ODN 1826 (a TLR9 ligand) and flagellin from *Salmonella typhimurium* (a TLR5 and NLRC4 ligand). We immunized wild type and knockout mice for TLR3, 5 and 9 with adjuvants and chimeric anti-DEC205, anti-DCIR2 or isotype control (Iso) fused to the *Plasmodium vivax* MSP1₁₉ protein that contains a pan allelic DR epitope (PADRE) in its C-terminal portion recognized by $CD4^+$ T cells from the H-2^b haplotype. After the administration of two doses, we evaluated the humoral (anti-MSP1₁₉ antibody titers) and cellular (cytokine production and proliferation by $CD4^+$ T cells) immune responses in the different groups. Our results indicate that, irrespectively of the adjuvant, the majority of parameters analyzed points out to the superiority of antigen targeting to the DEC205 receptor.

Keywords: Dendritic Cells. TLRs. vaccines. DEC205. DCIR2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões Endêmicas da Malária.....	12
Figura 2 - Ciclo de vida no hospedeiro definitivo.....	13
Figura 3 - Proteína 1 de Superfície do Merozoíta.....	16
Figura 4 - Vias de Sinalização dos TLRs 3, 5 e 9.....	24
Figura 5 - Receptores de dsRNA.....	25
Figura 6 - Estratégia de Análise.....	35
Figura 7 - Comparação de amostras de células estimuladas com as não estimuladas.....	36
Figura 8 - A produção de anticorpos contra a MSP1 ₁₉ depende da sinalização via TLR9.....	38
Figura 9 - CpG ODN: Razão IgG1/IgG2a.....	39
Figura 10 - A sinalização via TLR9 favorece a produção de citocinas no direcionamento de antígenos via anti-DEC205.....	41
Figura 11 - A sinalização via TLR9 favorece a proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ no direcionamento do antígeno via anti-DEC205.....	44
Figura 12 - A administração de 33D1 MSP1 ₁₉ _PADRE na presença de flagelina induziu resposta humoral estatisticamente diferente da resposta induzida pelo anti-DEC MSP1 ₁₉ _PADRE no pré-reforço em animais W/T.....	44
Figura 13 - Flagelina: Razão IgG1/IgG2a.....	45
Figura 14 - O direcionamento de antígenos via anti-DEC205 favorece a produção de citocinas quando empregamos a flagelina como adjuvante.....	47
Figura 15 - O emprego da flagelina favorece a proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ no direcionamento de antígenos via 33D1.....	48
Figura 16 - Produção de IgG total contra MSP1 ₁₉ induzida por poly I:C foi semelhante em todos os grupos.....	50
Figura 17 - O direcionamento de antígenos via anti-DEC205 favorece a produção de citocinas pró-inflamatórias por células T CD4 ⁺ quando poly I:C é empregado como adjuvante.....	51
Figura 18 - O emprego de poly I:C favorece a proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ no direcionamento de antígenos via anti-DEC205.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 A malária e o desafio de se desenvolver uma vacina	11
1.2 Malária Causada por <i>Plasmodium vivax</i>	14
1.3 MSP1₁₉ de <i>Plasmodium vivax</i>: Um importante candidato vacinal	15
1.4 O epítopo DR pan alélico (“Pan allelic DR epitope”, PADRE).	16
1.5 Células dendríticas (DCs) como ativadoras da resposta imune	17
1.6 Subpopulações de DCs	18
1.7 Direcionando antígenos para os receptores DEC205 e DCIR2 <i>in vivo</i>.	19
1.8 Receptores de Semelhantes a Toll (TLRs) e seus ligantes.	21
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos.	28
3 Material e Métodos	29
3.1 Animais utilizados.	29
3.2 Plasmídeos e Proteínas Recombinantes	29
3.3 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T	29
3.4 Precipitação e purificação dos anticorpos híbridos.	30
3.5 Ensaio para detecção de LPS.	30
3.6 Ensaio de imunização com os anticorpos monoclonais híbridos	31
3.7 Ensaio de ELISA	31
3.7.1 Preparo dos Soros	31
3.7.2 Sensibilização das Placas.	32
3.7.3 Diluição dos Soros e Reação Imunoenzimática.	32
3.8 Ensaio de ELISA para detecção das subclasses de imunoglobulinas G.	32
3.9 Ensaio de ELISPOT.	32
3.10 Marcação intracelular de células produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α.	33
3.11 Estratégias para análise de citometria de fluxo	33
3.12 A análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela diluição do corante CFSE.	37
3.13 Análise estatística.	37
4 Resultados e Discussão	38
4.1 O CpG ODN tipo B como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs ..	38
4.2 Flagelina FliC de <i>Salmonella typhimurium</i> como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs.	42
4.3 Poly I:C como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs.	48
5 Conclusões	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária e o desafio de se desenvolver uma vacina

A malária possui sintomas bem característicos como intensos calafrios, períodos de febre que duram de 3 a 4 horas, ocorrendo em ciclos diários ou em intervalos de 1 a 2 dias. A incidência dessa doença se dá principalmente na zona tropical (**figura 1**), sendo que a maioria dos casos é registrada no continente africano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). Cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* foram descritas como causadoras da malária: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. A infecção por *P. knowlesi* é mais rara em seres humanos, e difícil de diagnosticar. O primeiro caso registrado foi em 2004 (DANESHVAR et al., 2013). Já os *P. ovale* e *P. malariae*, são responsáveis pelas formas mais brandas da doença e possuem menor prevalência; *P. vivax*, provoca a maioria das infecções e *P. falciparum* induz as formas mais severas da doença e a maioria das mortes por malária. Cerca de 80% dessas mortes são registradas em apenas 14 países da África, havendo uma alta correlação com os menores índices de desenvolvimento econômico do mundo. Além da maior exposição a infecções por malária, essas populações sofrem com a deficiência da assistência de saúde pública, saneamento básico e quadros graves de desnutrição crônica, tornando-as mais frágeis frente a qualquer infecção, inclusive malária.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2010 ocorreram 219 milhões de casos de malária no mundo e que 0,30% resultou em morte. Além disso, a partir de 2010, houve uma redução de 25% da mortalidade por essa doença (OMS, 2013). Entretanto, a endemia da malária causa graves problemas sociais, principalmente nas zonas rurais. As sucessivas infecções debilitam a faixa economicamente ativa da população, além de influenciar nas taxas de frequência escolar. Crianças e gestantes são mais suscetíveis a desenvolverem casos mais graves da doença, sendo que diversos estudos demonstram complicações pré e pós natais decorrentes de infecções gestacionais (PIOLA, 2013). Diante disso, é imprescindível o desenvolvimento de métodos profiláticos contra a malária. Uma abordagem bem sucedida é a de controle do vetor artrópode do gênero *Anopheles*. O primeiro país a adotar esse método foi a Itália, na década de 20, resultando na erradicação da doença na região norte do país. Porém, essa prática pode se tornar inviável em alguns ecossistemas, ou provocar graves danos ao ambiente.

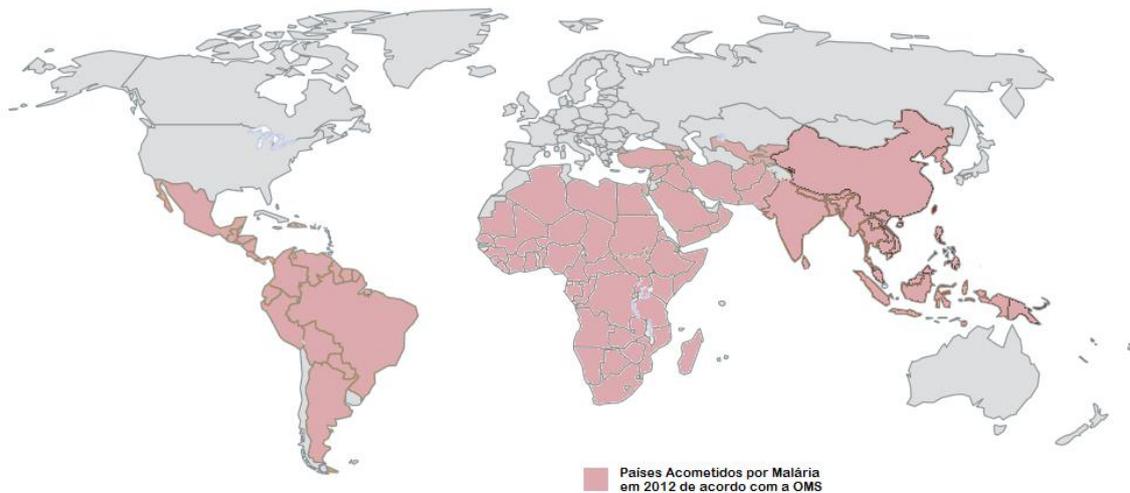


Figura 1 - Regiões Endêmicas da Malária. A doença acomete principalmente a faixa tropical do globo terrestre. Um dos fatores que delimitam as regiões de incidência é o habitat de seu vetor, um artrópode do gênero *Anopheles* (adaptado de OMS, 2013).

Assim, uma alternativa interessante é a vacinação. Introduzida na ciência ocidental por Edward Jenner durante o século XVIII, a vacinação é um dos métodos profiláticos mais importantes para a saúde pública, promovendo a erradicação de doenças como a varíola. Consiste em induzir uma resposta imune contra um agente etiológico, tornando o indivíduo resistente a futuras infecções. Apesar do crescimento exponencial da biotecnologia, o desenvolvimento de vacinas não acompanhou o mesmo ritmo e muitas doenças, como a malária, ainda carecem de um produto eficaz e correspondente às necessidades sociais e econômicas das pessoas.

Diversos fatores dificultam esse objetivo. Diferentemente dos vírus e bactérias, o *Plasmodium* é um organismo eucarioto. Portanto, possui armazenado em seu DNA, uma quantidade muito maior de informações, bem como um sofisticado sistema de regulação da expressão gênica. Isso permite que o protozoário tenha uma complexa variedade fenotípica a cada fase do seu ciclo de vida, o que potencializa sua capacidade de evadir aos ataques do sistema imunológico e de interagir com o hospedeiro vertebrado. Algumas particularidades do seu ciclo de vida, esquematizado na **figura 2**, também são obstáculos para estratégias vacinais.

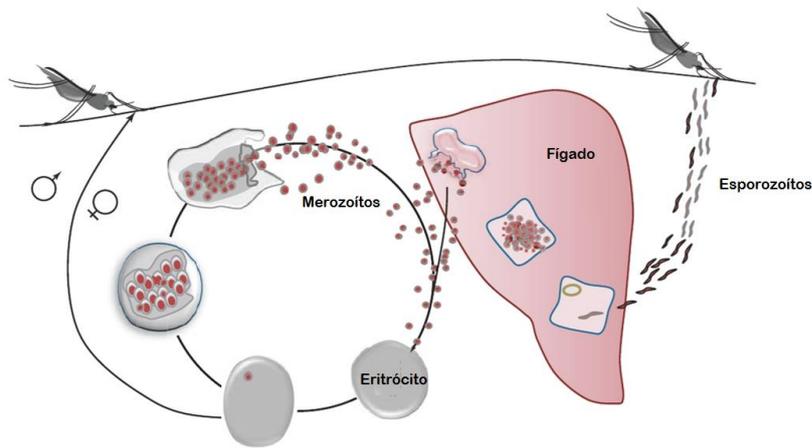


Figura 2 - Ciclo de vida no hospedeiro humano. Quando o vetor anofelino realiza o repasto sanguíneo, deposita na pele a saliva contaminada com esporozoítos. Estes infectam o fígado, onde invadem os hepatócitos e começam sua reprodução assexuada chamada de esquizogonia. Em seguida sofrem multiplicação e diferenciação em merozoítos, que são liberados no sangue. Estes invadem os eritrócitos, se multiplicam formando gametócitos ou novos merozoítos. Os gametócitos infectam um novo vetor, dando continuidade ao ciclo. Já a liberação de merozoítos se repete sucessivamente a cada dois ou três dias.

A divisão em duas fases, a primeira hepática e a segunda sanguínea, ajuda o *Plasmodium* a escapar do ataque do sistema imunológico. Ainda, a cada estágio dessas duas fases, o protozoário muda constantemente de fenótipo. Essas mudanças dificultam em termos de tempo e eficácia o desenvolvimento de uma resposta imune contra ele. Além disso, há uma grande dificuldade em definir os correlatos de proteção, ou seja, o que deve acontecer na resposta imune para eliminar completamente o parasita e prevenir futuras infecções.

Muitas estratégias foram testadas nas últimas décadas para superar esses desafios. Uma abordagem interessante é impedir a infecção desenvolvendo uma resposta contra os esporozoítos ou parasitas na fase hepática. Essas são as vacinas pré-eritrocíticas.

As vacinas de DNA são uma alternativa, pois podem induzir respostas contra múltiplas subunidades de antígenos. Além disso, são eficazes em ativar linfócitos T CD8⁺, importantes na resposta imune contra parasitas intracelulares. Dessa forma o parasita poderia ser destruído já na fase inicial da doença, com a morte do hepatócitos infectados. Richie e colaboradores estão testando uma vacina heteróloga contra *Plasmodium falciparum* baseada na administração de quatro doses de vacinas de DNA, seguidas de um reforço com adenovírus transgênico, ambos contendo genes que expressam a proteína circumsporozoíta (CSP) e o antígeno 1 da membrana apical (AMA1) (RICHIE et al., 2013). O teste clínico em fase I apresentou uma imunidade esterilizante de apenas 27% dos voluntários. Além disso, o alto

custo, tanto da vacina de DNA quanto viral, e o número de doses administradas inviabilizam seu emprego na saúde pública de países pobres.

Outra vacina, já em fase IV de testes clínicos, é a RTS/S, formulada com epítopos da CSP conjugados ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) administrados com o adjuvante AS01. Há relatos de 30 a 50% de proteção e diminuição da carga parasitária em indivíduos previamente imunizados. Porém, esses resultados estão longe de representarem uma vacina ideal (AGRAWAL et al., 2003; RICHIE et al., 2010). Além das vacinas contra a fase pré-eritrocítica, existem também vacinas contra a fase sanguínea.

Teoricamente, estas vacinas contra os merozoítos não evitam a infecção, mas podem induzir uma resposta capaz de eliminar completamente os parasitas da fase sanguínea, ou que diminua consideravelmente a carga parasitária. Reduziríamos assim o tempo de infecção, atenuando os sintomas e, possivelmente, evitando que o doente infecte outro vetor anofelino, o que interromperia o ciclo de vida do *Plasmodium*. A principal barreira que essas vacinas enfrentam é o alto nível de polimorfismos apresentados pelos antígenos dos merozoítos. Infelizmente, os testes clínicos obtiveram resultados negativos: apenas dois programas chegaram até a fase 2b, os outros foram descontinuados já nas primeiras etapas da fase 1 e 2 (RICHIE et al., 2010).

Porém, há muito ainda o que se explorar. Um estudo usando baixas doses de hemácias infectadas com *Plasmodium* atenuado, seguidas de tratamento com anti-maláricos induziu imunidade esterilizante em três de quatro indivíduos desafiados. Em seguida, a resposta imune foi analisada. Esse método induziu a ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ (POMBO et al., 2002). Roestenberg e colaboradores usaram uma estratégia semelhante em dez voluntários. Todos eles foram protegidos ao serem desafiados. A fim de investigar a resposta induzida, os leucócitos desses pacientes foram re-estimulados *in vitro* com antígenos do protozoário. Foram detectados linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , TNF α e IL-2, sugerindo assim um possível marcador de proteção imunológica realizada por essas células. Essa descoberta dá pistas de que tipo de resposta imunológica devemos buscar desenvolver com uma vacina (ROESTENBERG et al., 2009).

Dentre alguns métodos recém desenvolvidos, o direcionamento de antígenos para células dendríticas parece promissor. Estas células ocupam papel central na ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e por isso podem ser cruciais no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a malária.

1.2 Malária Causada por *Plasmodium vivax*

Apesar de provocar menos complicações clínicas que o *P. falciparum*, o *P. vivax* é responsável por cerca de 400 milhões de infecções por ano em todo o planeta. A grande maioria dos casos de malária registrados no Brasil é causada por *P. vivax*, muitos deles assintomáticos. Dados do ministério da Saúde apontam que o número de infecções e internações vem caindo constantemente nos últimos 6 anos, por conta da melhoria no sistema público de saúde. Porém, graças ao desenvolvimento de diagnósticos clínicos, está sendo possível detectar diversas complicações relacionadas a essa espécie. Já foram documentados casos de trombocitopenia, malária cerebral, insuficiência aguda renal, hepática e pulmonar, além do rompimento de baço.

Estudos apontam o crescente desenvolvimento de resistência a alguns antimaláricos por essa espécie de protozoário. Isto pode se tornar um grave problema de saúde pública no futuro, e torna imperativa a constante busca por novos medicamentos. O desenvolvimento de uma vacina capaz de tornar a população imune a malária seria a solução definitiva para o problema (NETTO et al., 2010).

1.3 MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax*: Um importante candidato vacinal

Responsável por cerca de 85% dos casos de malária no Brasil e 50% dos na Ásia, o *Plasmodium vivax* causa uma forma relativamente mais branda da doença. Porém, é responsável pela grande maioria de casos no mundo (OMS, 2013).

Uma proteína de superfície muito abundante nos merozoítos é a *merozoite surface protein 1* (MSP1). Esta proteína, ancorada a uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), é alvo da resposta humoral de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, pois exibe vários epítomos imunogênicos. A grande quantidade de anticorpos contra MSP-1 observada em pacientes assintomáticos e infectados por *Plasmodium* a torna um interessante candidato vacinal (PATHAK et al., 2008). Porém, esta molécula faz parte de um grupo de proteínas de superfície do *Plasmodium vivax* que mudam constantemente a cada fase do seu ciclo de vida. Isso ocorre por uma complexa regulação da expressão de seus genes (HOLDER et al., 2009).

Além da expressão diferenciada, algumas dessas proteínas sofrem ação de proteases, que as clivam sucessivamente, mudando constantemente os epítomos dos antígenos expostos ao sistema imune. A MSP1 é processada por uma série de serino proteases (KNUEPFER et al., 2009) (figura 3) resultando em quatro fragmentos: 83, 30, 38 e 42 kDa ligados à superfície do parasita. Em seguida, o fragmento de 42 kDa passa por um novo processamento que forma

mais dois fragmentos, um de 33 kDa e o de 19 kDa. Apenas o fragmento de 19 kDa permanece ligado ao merozoíto e é chamado de MSP1₁₉ (DEIGHTON et al., 1992; HOLDE et al., 1994; STOCKINGER et al., 2001). Não existem correlatos de proteção referentes à presença de anticorpos específicos contra MSP1₁₉, mas sim à um estado assintomático e com uma grande supressão da carga parasitária no sangue. Diversos ensaios envolvendo subunidades de MSP1 dos plasmódios *yoelii* e *falciparum* foram testados respectivamente em camundongos e primatas. A grande maioria deles apontou atenuação dos sintomas ou proteção total nos ensaios de desafio (GUERRERO et al., 1992; MENDEZ et al., 2005; TAKACS et al., 1992), o que motivou outros grupos de pesquisa a iniciarem testes em humanos. Apesar dos resultados promissores em modelos murinos, os testes em humanos fracassaram, apresentando apenas proteções parciais (GELBAND et al., 2006).

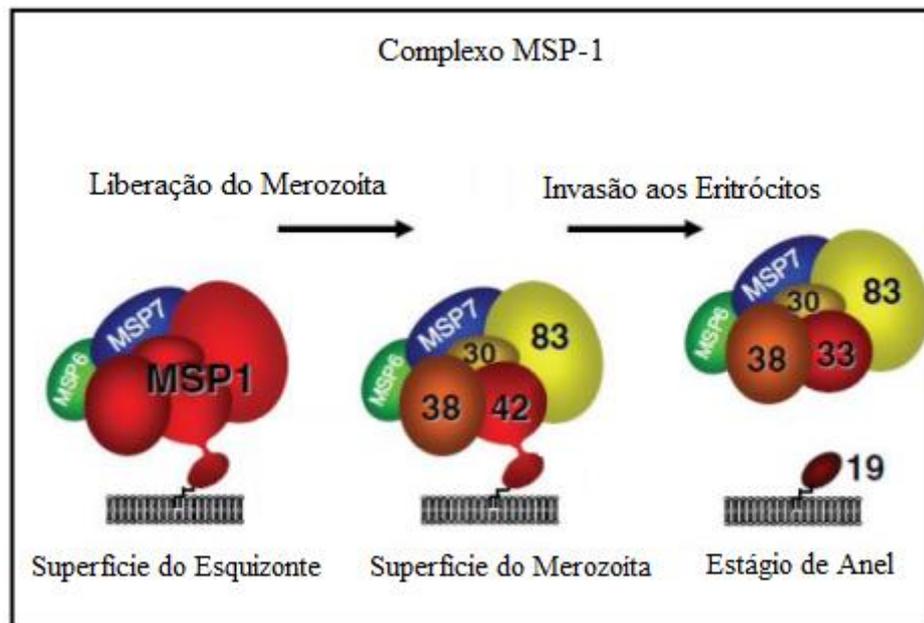


Figura 3 - Proteína 1 de Superfície do Merozoíto: A figura mostra as sucessivas clivagens sofridas pela MSP1 até a formação da MSP1₁₉.

1.4 O epítipo DR pan alélico (“Pan allelic DR epitope”, PADRE)

Acoplamos o epítipo PADRE a fim de aumentar a imunogenicidade do antígeno MSP1₁₉. Este epítipo sintético liga-se com alta afinidade na maioria das moléculas HLA-DR o que o torna um excelente candidato à componente vacinal. Além disso, se liga ao MHC II murino (I-A^b) expresso por camundongos da linhagem C57BL/6, servindo como modelo de estudos. Essas características o tornam capaz de auxiliar no desenvolvimento de potentes

respostas de células T auxiliaadoras tanto em humanos, quanto em camundongos dessa linhagem (MAEWAL et al., 1994).

Outros estudos já demonstraram a influência da fusão do epítoto PADRE com a proteína MSP119. Foi observado um importante aumento da resposta humoral quando diferentes adjuvantes foram utilizados combinados a essa fusão (ROSA et al., 2004).

1.5 Células dendríticas (DCs) como ativadoras da resposta imune

Encontradas principalmente na pele, mucosas e órgãos linfoides, as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos capazes de iniciar e regular a resposta imune (STEINMAN; COHN, 1973). Elas tem papel fundamental ligando a imunidade inata à adquirida. Essa função se dá graças a um sofisticado mecanismo que reconhece moléculas não próprias e sinais de “perigo”. Além disso, sua capacidade de migrar pelo organismo possibilita que capturem antígenos em diversos órgãos, como epitélio e mucosas, e os levem até os tecidos linfoides, onde ocorre a apresentação destes para os linfócitos T (STEINMAN, 2008). Essa apresentação pode ocorrer basicamente em dois contextos: na presença de sinais de “perigo”, provocando a indução de imunidade ou na ausência desses sinais, induzindo a tolerância imunológica.

Os sinais de perigo são marcadores que indicam se há algum desequilíbrio na homeostase do organismo, ou que algum patógeno invadiu o sistema. Estes sinais são captados por receptores da imunidade inata e desencadeiam um processo de maturação das DCs. Este processo de maturação consiste em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas ao aumento da capacidade de processar antígenos e ativar linfócitos T. Essas mudanças incluem aumento da expressão de complexos peptídeo - MHC (INABA et al., 2000), aumento da expressão de CD48 e CD58 que favorecem a ligação a células T, além de aumento de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 (INABA et al., 1994), produção de quimiocinas (SALLUSTO et al., 1999), citocinas como IL-12 (EDWARDS et al., 2002) e interferons do tipo I (DALOD et al., 2002).

As alterações descritas acima permitem que haja apresentação dos antígenos aos linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺, induzindo-os à desenvolverem uma resposta específica. Esse processo pode modular a atividade de células T auxiliaadoras do tipo I e II, ação citotóxica das células T CD8⁺, produção de anticorpos por linfócitos B, memória imunológica, ativação de células *natural killers* (NK), dentre outros.

Já na ausência desses sinais de perigo as DCs induzem tolerância. Esta se dá ativando linfócitos T reguladores e também induzindo a proliferação de células T CD4⁺ irresponsivas. Dessa forma, as DCs participam do processo de tolerância imunológica, prevenindo ataques contra o próprio organismo (BONIFAZ et al., 2002; HAWIGER et al., 2001).

Por sua notável importância na ativação da resposta imune, diversos grupos vêm estudando as funções e fenótipos das DCs. O desenvolvimento de marcadores celulares possibilitou a descrição de diferentes subpopulações dessas células, bem como seus papéis na maquinaria imunológica.

1.6 Subpopulações de DCs

As DCs podem ser subdivididas através da utilização de diversos marcadores (VILLADANGOS; YOUNG, 2008). Estes são normalmente receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos (receptores semelhantes a Toll, por exemplo) ou na apresentação de antígenos (revisto por STEINMAN, 2008). Podemos dividir basicamente as DCs em 3 subpopulações: DCs clássicas CD8 α ⁺, DCs clássicas CD8 α ⁻ e as células dendríticas plasmocitóides. Este trabalho tem como foco as subpopulações de DCs clássicas, ou convencionais, que são encontradas principalmente no baço de camundongos.

A subpopulação positiva para o marcador CD8 α expressa o receptor endocítico DEC205 (também conhecido como CD205) sendo conhecida como subpopulação CD8 α ⁺DEC205⁺. Este receptor endocítico de 205 kDa é caracterizado por seus vários domínios como os ricos em cisteínas, os semelhantes ao tipo C de lectinas e o de fibronectina tipo II. Possuem também uma sequência de internalização em sua porção citoplasmática (JIANG et al., 1995; MAHNKE et al., 2000). Além de nas DCs, esse receptor é encontrado também em linfócitos B, T e em células epiteliais do timo. Sua função não está completamente elucidada mas sabe-se que possui capacidade de ligação à certos carboidratos, capacidade endocítica e que é reciclado nos compartimentos endossomais e lisossomais tardios (BOEHMER et al., 2005; STEINMAN et al., 2002). Recentemente, pesquisadores propuseram que a endocitose do CpG ODN do tipo B é feita pelo DEC205 utilizando camundongos deficientes para este receptor (CAMINSCHI et al., 2012).

As DCs CD8 α ⁺DEC205⁺ são especializadas na captura de células mortas e tem importante papel na resistência contra certas infecções virais (ALLAN et al., 2003; DEN HAAN et al., 2000; IYODA et al., 2002). Alguns pesquisadores sugerem que essas células também são especializadas em apresentação cruzada, que consiste em apresentar

antígenos não replicativos para células T CD8⁺ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do tipo I (DEN HAAN et al., 2000; DEN HAAN; BEVAN, 2002; IYODA et al., 2002; POOLEY et al., 2001; SCHINECKER et al., 2002; SCHONRRER et al., 2006). De fato, recentemente foi demonstrado que a subpopulação CD8⁺DEC205⁺ é capaz de mediar o processo de apresentação cruzada de maneira eficiente, além de também fazer apresentação para células T CD4⁺ (DUDZIAK et al., 2007).

As DCs CD8⁺ expressam em sua superfície o receptor endocítico DCIR2. Semelhantemente ao DEC205, o DCIR2 é também um receptor lectina tipo C, porém do tipo II. Além disso, difere do DEC205 por conter apenas um domínio de ligação à carboidratos (FIGDOR et al., 2002). A subpopulação de DC CD8⁺DCIR2⁺ é descrita por sua alta eficiência em processar e apresentar antígenos via MHCII, ativando assim linfócitos T CD4⁺ (VILLADANGOS; SCHNORRER, 2007).

1.7 Direcionando antígenos para os receptores DEC205 e DCIR2 *in vivo*

A conjugação de antígenos a anticorpos contra receptores endocíticos vem sendo amplamente estudada como abordagem vacinal. Receptores como Clec9A, DCIR2, DC-SIGN, DEC205 e CD209 estão sendo conjugados a diversos candidatos vacinais que envolvem proteínas derivadas de diferentes patógenos como *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*, *Yersinia pestis* e o vírus da imunodeficiência adquirida, e administrados na presença de diferentes adjuvantes. A literatura científica mostra que os receptores DEC205 e DCIR2 são candidatos interessantes para o desenvolvimento de estratégias vacinais.

O direcionamento de antígenos para células dendríticas utilizando o anticorpo anti-DEC205 foi inicialmente descrito por Bonifaz et al. (2002) e Hawiger et al. (2001). Nesses estudos iniciais, o anticorpo anti-DEC foi conjugado ou fundido diretamente a antígenos como a ovalbumina (OVA) e lisozima de ovo de galinha (HEL). A administração desses anticorpos quiméricos (anti-DEC-OVA e anti-DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos à subpopulação de DCs CD8⁺DEC205⁺ *in vivo*. O antígeno foi então eficientemente processado e apresentado tanto a células T CD4⁺ quanto CD8⁺ transgênicas. Na ausência de inflamação, esse tipo de direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica, medida pela deleção de células T transgênicas específicas para o antígeno utilizado.

Entretanto, o direcionamento de antígenos na presença de um estímulo de maturação, como a administração de anticorpo agonista anti-CD40, que induz a maturação das DCs, promoveu a ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, a imunidade induzida pelo direcionamento do antígeno às DCs foi de longa duração e mais efetiva do que a administração de potentes adjuvantes como adjuvante completo de Freund.

Camundongos vacinados com o anticorpo anti-DEC-OVA na presença do anticorpo agonista anti-CD40 se tornaram resistentes a infecção com um vírus vaccínia transgênico expressando OVA (BONIFAZ et al., 2004). E a imunização de animais com o mesmo anticorpo promoveu a ativação de células T CD4⁺ de memória, que são importantes para a ativação de linfócitos B antígenos específicos (BOSCARDIN et al., 2006).

Os estudos citados acima abriram a possibilidade de se utilizar anticorpos quiméricos anti receptores endocíticos como DEC205 e DCIR2 conjugados a antígenos clinicamente relevantes para a indução de imunidade protetora contra diferentes doenças prevalentes. Boscardin et al. (2006) utilizaram o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína circunsporozoita (CS) expressa pelas formas esporozoitas do *Plasmodium yoelii*.

A administração de uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CS na presença de um estímulo de maturação para as DCs foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, a indução de resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante. O anticorpo anti-DEC205 também já foi acoplado à proteína GAG do vírus HIV e a imunização com o anticorpo quimérico anti-DEC-GAG foi capaz de levar a indução de uma resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Além disso, proteção foi observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-GAG quando estes foram desafiados com um vírus vaccínia transgênico expressando a proteína GAG (TRUMPFHELLER et al., 2006; TRUMPFHELLER et al., 2008). A eficácia da imunização com DNA também pode ser aumentada quando se utilizou um plasmídeo codificando para o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína GAG (NCHINDA et al., 2008). É interessante ressaltar que as publicações citadas acima utilizaram concentrações relativamente baixas dos anticorpos quiméricos (5-10 ug/camundongo) e foram capazes de gerar respostas imunes tão potentes ou superiores àquelas geradas por imunizações padrão (BOSCARDIN et al., 2006; SEADER et al., 2010).

A dualidade da resposta frente ao direcionamento de antígenos, ou seja, indução de tolerância ou resposta contra o antígeno, levou alguns grupos a direcionarem tanto o antígeno

quanto o estimulador de maturação das DCs. Algumas abordagens tentam investigar soluções para garantir uma resposta totalmente imunizante. Um exemplo disso é a construção de plasmídeos recombinantes expressando a toxina tetânica, α CD40 agonista e α DEC205 (ALEXANDER et al., 2013). Já outro estudo desenvolveu um complexo proteína/DNA, onde foram acoplados CpG ODN, α DEC205 e o antígeno OVA. Neste houve um significativo aumento da resposta celular quando comparada com aquela desenvolvida pela formulação de α DEC205–OVA acrescida de CpG (DIEBOLD et al., 2012). Esses trabalhos obtiveram êxito em melhorar a qualidade da resposta imunológica, o que mostra a complexidade do modelo de direcionamento *in vivo*.

Soares e colaboradores compararam o direcionamento da proteína LACK presente em *Leishmana major* para os receptores endocíticos DEC205 e DCIR2. Este estudo demonstrou que ambas as subpopulações são capazes de induzir uma resposta de linfócitos T CD4⁺, porém o direcionamento para DCIR2 por meio do anticorpo 33D1, ligante de DCIR2, provocou uma resposta T auxiliadora superior (SOARES et al., 2008).

Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos, o anticorpo anti-DEC205 humano também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs. Bozzacco et al (2007) mostraram ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de IFN- γ quando o anticorpo anti-DEC205 humano em fusão com a proteína GAG do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes aids e depois re-estimulado com as células T destes mesmos pacientes. Gurer et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram um anticorpo anti-DEC humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr.

O antígeno NY-ESO-1 é amplamente expresso em diversos tipos de tumores. Um grupo avaliou o perfil de resposta imunológica provocado pelo direcionamento ao receptor DEC205 *in vitro*. Neste trabalho foi constatada a capacidade de desenvolver uma ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos (GNJATIC et al., 2011). Esses resultados se mostraram tão promissores que testes clínicos já começaram a ser feitos empregando o adjuvante poly ICLC. No momento estão recrutando pacientes voluntários com diagnóstico de tumores sólidos positivos para esse antígeno (NCT01188096 www.clinicaltrials.gov).

1.8 Receptores de Semelhantes a Toll (TLRs) e seus ligantes

Como mencionamos anteriormente, as DCs identificam a presença de patógenos e outros sinais de “perigo” através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares expressos por vários microorganismos além de estímulos

endógenos. Os TLRs são atualmente os PRRs mais bem caracterizados. A **tabela 1** mostra diversos agonistas de TLRs já descritos. A ativação dos TLRs é imprescindível para as funções das DCs, especialmente em processos como endocitose, rearranjo de citoesqueleto, migração, processamento e apresentação de antígenos, expressão de moléculas co-estimulatórias e secreção de citocinas.

Tabela 1 - TLRs e seus Agonistas. A tabela mostra agonistas naturais e sintéticos de TLRs.

TLRs	Bacterianos	Virais	Fúngicos/ vegetais	Parasitários	Endógenos	Sintéticos
TLR1+2 TLR2+6	Lipoproteínas, Lipopeptídeo, Peptídeoglicano, Ácido lipoteiólico, Alguns LPS	Hemaglutinina, Glicoproteína B de citomegalovírus humano.	Zimosan, B-glicano	Glicosil- fosfatidil-inositol (Trypanosoma)	Heat shock proteins (HSP)	Lipoproteína sintética (Pam3Cys)
TLR3		RNA genômico dupla fita e intermediários				Poly (I:C)
TLR4	LPS, HSP	Proteína F de vírus sincicial respiratório, Envelope de vírus do tumor mamário de camundongo.	Taxol		HSP60, HSP70, Fibrinogênio, Fibronectina, Oligossacarídeo Ác. hialurônico, Dectina, Ácido úrico.	
TLR5	Flagelina					
TLR7 TLR8		RNA dupla fita genômico			RNA de vertebrado	Poly U-RNA Poly GU-RNA Análogos de guanosina, siRNA
TLR9	DNA genômico DNA plasmidial	DNA genômico		Hemozoína (hemácias parasitada) DNA de parasitas?	Complexo IgG/cromatina Complexo de lipídeo catiônico/DNA de vertebrado	CpG-ODN (tipos A, B e C) non-CpG-ODN hemozoína sintética
TLR10	Indefinido	Indefinido	Indefinido	Indefinido	Indefinido	Indefinido
TLR11	Bactérias uropatogênicas					

Até o momento, 13 membros desta família foram identificados (TLRs 1 a 13). Os TLRs 1 a 9 são conservados em humanos e camundongos, o TLR 10 é expresso somente em humanos e o TLR11 é funcional em camundongos (WEST et al., 2006). Ainda que muita informação esteja disponível em relação às atividades funcionais dos TLRs 1 a 9 e 11, ainda pouco se conhece sobre a fisiologia dos TLRs 10, 12 e 13. Os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 11 são expressos na superfície das células e podem ser ativados por moléculas geralmente localizadas na superfície de bactérias, fungos ou protozoários. Já os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados no retículo endoplasmático e reconhecem ácidos nucléicos microbianos (KAWAI; AKIRA, 2007). A subpopulação de DCs convencionais CD8 α ⁺ DEC205⁺ parece expressar todos os TLRs à exceção dos TLRs 5 e 7. De fato, estas células são irresponsivas às imidazoquinolinas (ligantes de TLR7), porém a ação da flagelina (ligante de TLR5) não foi

avaliada (EDWARDS et al., 2003). Segundo dados não publicados obtidos pelo grupo de pesquisa de Michel Nussenzweig, utilizando a técnica de *microarray*, a população de DCs CD8 α ⁻DCIR2⁺ expressa quantidades superiores de TLR5 e 7 quando comparada com a subpopulação CD8 α ⁺DEC205⁺.

A **figura 4** mostra que após a interação com seus agonistas, os TLRs iniciam uma série de cascatas de sinalização que levam à ativação de fatores de transcrição específicos como NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e AP-1 (*activator protein-1*). Estes fatores agem sobre genes específicos, que codificam proteínas importantes para a maturação das DCs o que pode levar à estimulação de linfócitos T e B. Todos os membros da família dos TLRs, a exceção do TLR3, induzem a ativação dos fatores NF- κ B e AP-1 por meio do recrutamento do adaptador MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*). Diferentemente, o TLR3 sinaliza via um adaptador conhecido como TRIF (*TIR domain containing adaptor-inducing IFN-beta*, Kaisho; Akira, 2006). Enquanto NF- κ B e AP-1 são ativados pela sinalização de todos os TLRs, somente alguns deles são também capazes de induzir a ativação dos IRF (*interferon regulatory factor*) 3 e 7, que regulam a expressão de interferons do tipo I (TAKEDA; AKIRA, 2004). A indução de interferons do tipo I é dependente de TRIF para o TLR3 e de MyD88 para os TLRs 2, 7, 8 e 9 (BARBALAT et al., 2009; STETSON; MEDZHITOV, 2006; YANG et al., 2005). A tabela 1 mostra os diferentes TLRs e seus respectivos ligantes naturais e sintéticos. Como diferentes populações de DCs expressam vários desses TLRs, seus ligantes vem sendo testados como adjuvantes em protocolos de imunização com o objetivo de induzir maturação das DCs e consequente ativação do sistema imune. Neste projeto, utilizamos os seguintes ligantes de TLRs: poly(I:C), flagelina de *Salmonella typhimurium* e CpG ODN 1826.

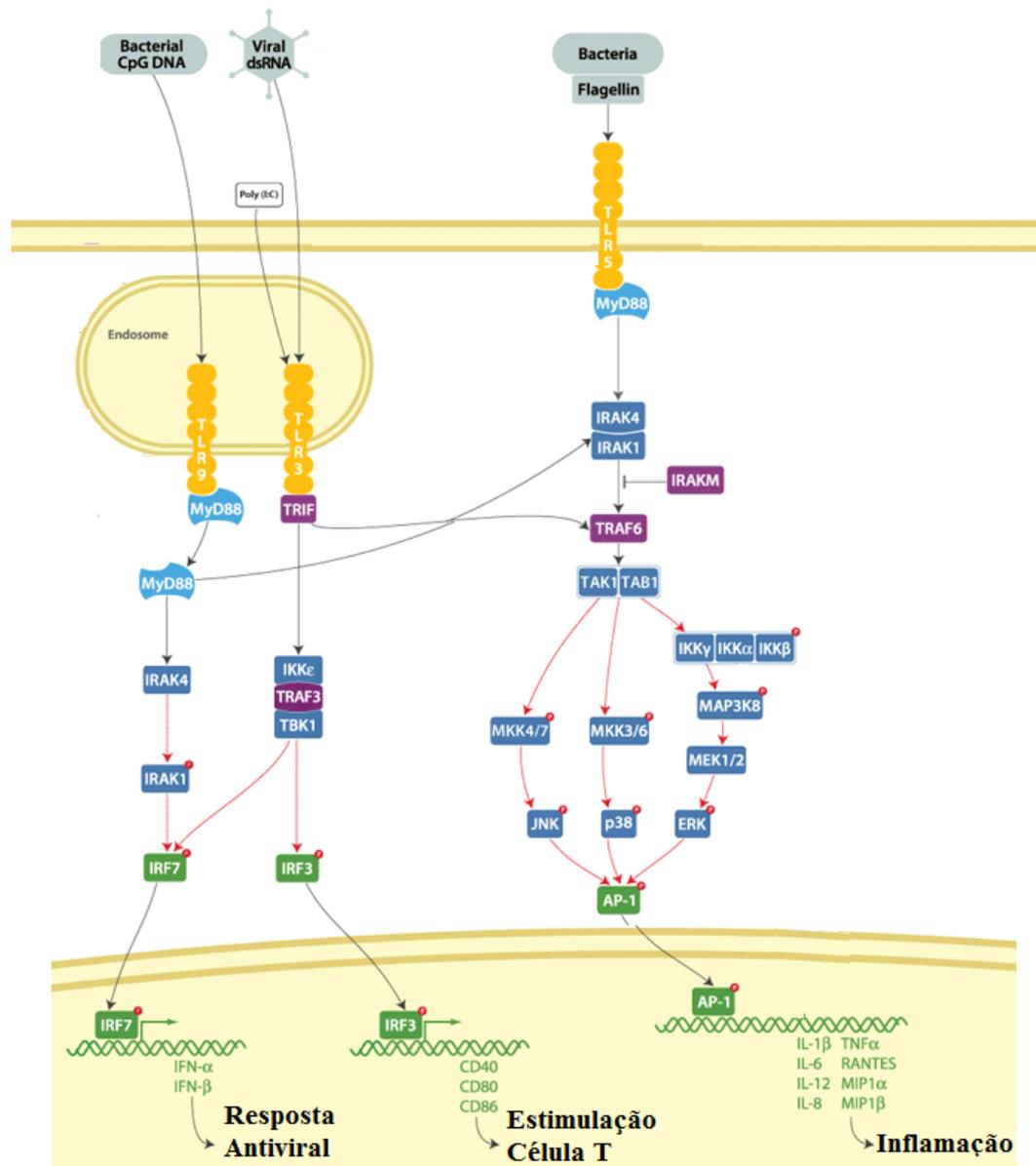


Figura 4 - Vias de Sinalização dos TLRs 3, 5 e 9. A figura mostra as vias de sinalização dos receptores do tipo Toll. Cada uma das vias culminam em respostas ativadoras do sistema imune, como a inflamação, estimulação de células T e principalmente a maturação de células dendríticas.

A descoberta de que RNA dupla fita (dsRNA) ligava-se ao TLR3 foi feita por Alexopoulou et al. (2001). O dsRNA pode ser constituinte do genoma viral ou pode ser produto intermediário durante o ciclo de replicação de alguns vírus (Jacobs e Langland, 1996). A **figura 5** mostra que além do TLR3, dsRNA também é reconhecido por outros receptores citoplasmáticos como proteínas quinases R, 2'-5'oligoadenilto sintases, por helicases de RNA como RIG-1 (*retinoic acid inducible gene-1*) e MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) (BOWIE, 2008). A localização celular e as especificidades de ligantes diferem entre TLR3 e helicases de RNA RIG-1/MDA-5. Porém, a sinalização por

estes receptores converge para a produção de interferons do tipo I resultando na eliminação dos vírus (KAWAI; AKIRA, 2006).

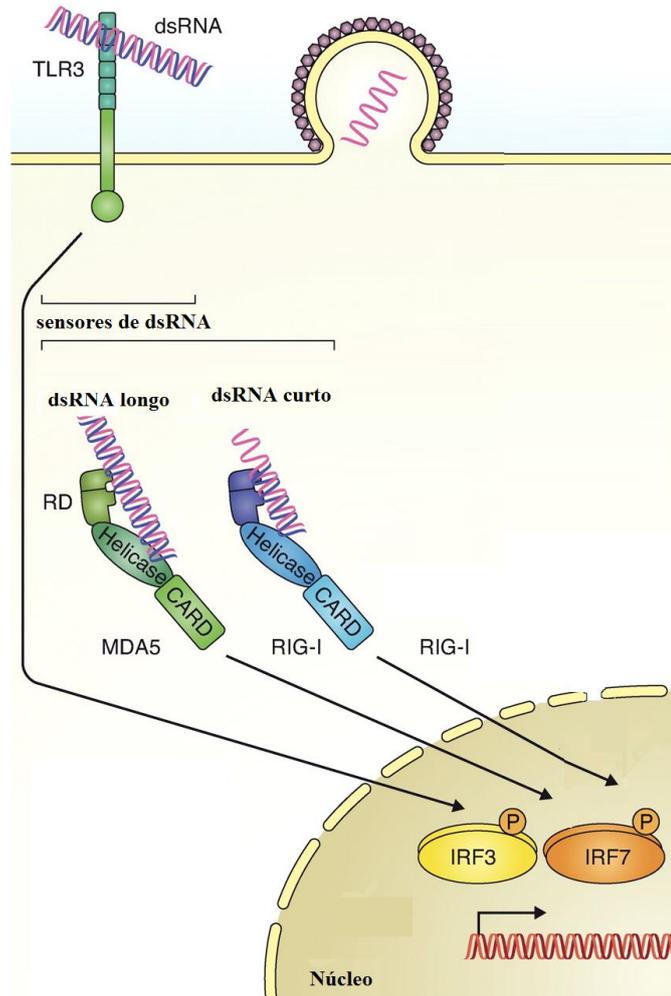


Figura 5 - Receptores de dsRNA. A figura mostra os receptores extra e intracelulares de dsRNA. TLR3 é um ligante extracelular, enquanto MDA5 e RIG-1 ligam-se em dsRNA presentes no citoplasma. MDA5 tem especificidade para cadeias longas, enquanto RIG-1 para cadeias curtas.

O ácido poliriboinosínico:poliribocitidílico (poly (I:C)) é um análogo sintético do dsRNA e tem sido estudado como ligante para mimetizar infecções virais (MATSUMOTO; SEYA, 2008). O poly (I:C) pode produzir alguns efeitos colaterais *in vivo* (ROBINSON et al., 1976) quando utilizado em altas doses. Portanto, uma versão menos tóxica denominada poly (I:C12U) foi desenvolvida para uso em seres humanos. Algumas diferenças foram descritas entre ambos no que diz respeito à ativação de DCs (AVRIL et al., 2009). Foi constatado que a sinalização através do poly (I:C12U) ativa somente o TLR3 enquanto que o poly (I:C) ativa tanto TLR3 quanto a helicase MDA5 (TRUMPFHELLER et al., 2008). Foram obtidos

resultados promissores quando administraram o poly (I:C) como adjuvante com os anticorpos quiméricos (NCHINDA et al., 2008).

A imunização de diferentes linhagens de camundongos com uma dose do anticorpo quimérico anti-DEC-GAG na presença de anti-CD40+poly (I:C) foi capaz de induzir potente resposta de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-2 contra diferentes peptídeos presentes na proteína GAG. Esta única dose conferiu proteção quando os animais foram desafiados com um vírus vaccinia codificando para a proteína GAG (TRUMPFHELLER et al., 2006). Estes estudos foram aprofundados e duas doses do anticorpo anti-DEC-GAG na presença somente de poly (I:C) foram administradas. Os resultados mostraram a indução uma resposta de linfócitos T CD4⁺ polifuncional (com produção simultânea de IL-2, IFN- γ e TNF α) bastante duradoura e também protetora (TRUMPFHELLER et al., 2008). Além disso, os linfócitos T CD4⁺ induzidos pela vacinação com o anticorpo anti-DEC-GAG+poly (I:C) foram capazes de melhorar a resposta de células T CD8⁺ induzida por uma vacina de DNA (Nchinda et al., 2008). Uma resposta imune mediada por células T CD4⁺ e T CD8⁺ também foi obtida quando uma dose do anticorpo anti-DEC-CS (proteína circunsporozoita de *Plasmodium yoelii*) foi administrada na presença de anti-CD40+poly (I:C). Foram detectados altos títulos de anticorpos anti-CS no soro dos animais imunizados após a administração de uma dose de reforço (BOSCARDIN et al., 2006). Observou-se a indução de fortes respostas imunes tanto humoral quanto celular do tipo Th1 quando um análogo do poly (I:C) foi utilizado em conjunto com capsômeros do vírus HPV (“human papiloma virus”) em macacos rhesus (STAHL-HENNIG et al., 2009). Outro estudo, envolvendo primatas não humanos, demonstrou a ativação de uma resposta Th1 frente ao direcionamento do antígeno CS para o receptor DEC205 junto ao poly (I:C) (TEWARI et al., 2010). Diferentes arranjos de TLRs são expressos nas subpopulações de DCs, portanto, é de grande importância investigar quais os efeitos de outros agonistas no modelo de direcionamento de antígenos.

A flagelina é uma proteína de 50 kDa que constitui o flagelo de bactérias de diferentes espécies. Ela é detectada no meio extracelular através do TLR5 (HAYASHI et al., 2001) enquanto que seu reconhecimento citoplasmático se dá por meio de Ipaf (FRANCHI et al., 2006). Sua ligação ao TLR5 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-6 e IL-12 além de promover a expressão de proteínas de superfície celular envolvidas na apresentação de antígenos como MHC, CD40, CD80 e CD86 (CIACCI-WOOLWINE et al., 1998; DIDIERLAURENT et al., 2004; SMITH et al., 2003). Já se demonstrou que a flagelina induz maturação e produção de quimiocinas por DCs humanas (MEANS et al., 2003) resultando na estimulação de respostas do tipo Th1 (AGRAWAL et al., 2003). Além disso,

vários grupos têm utilizado diferentes flagelinas como adjuvantes em ensaios de imunização *in vivo*. A administração de flagelina juntamente com o antígeno F1 de *Yersinia pestis* induziu potente resposta humoral e foi capaz de proteger camundongos contra um desafio com este patógeno (HONKO et al., 2006).

A flagelina também já foi fundida a proteínas dos vírus Influenza (HULEATT et al., 2008) e West Nile (McDONALD et al., 2007) induzindo potente resposta de anticorpos e proteção contra desafio. As proteínas MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* e de *Plasmodium falciparum* foram fundidas a uma flagelina de *Salmonella typhimurium* e utilizadas em protocolos de imunização. Os resultados mostraram que a adição da flagelina foi capaz de induzir potente resposta de anticorpos contra a MSP1₁₉ de ambas as espécies (BARGIERI et al., 2010; BARGIERI et al., 2008). Além disso, quando a flagelina de *S. enterica* foi fundida a um epitopo para células T CD8⁺ derivado da proteína CS de *P. yoelii*, linfócitos T CD8⁺ foram detectados (BRAGA et al., 2010). O efeito da flagelina nas diferentes subpopulações de DCs ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, parece que a estimulação direta de DCs CD11c⁺ expressando o TLR5 é necessária para sua atividade adjuvante (BATES et al., 2009).

Os CpG oligodeoxinucleotídeos (CpG ODNs) contém domínios não metilados e ligam-se ao receptor TLR9. Essas moléculas sintéticas, análogas às encontradas em bactérias e alguns vírus, vêm sendo empregadas como adjuvantes em formulações vacinais contra diversas doenças infecciosas e tratamento contra o câncer. Alguns trabalhos evidenciam o papel do CpG na ativação de DCs e até na inibição de sua apoptose, aumentando sua sobrevivência *in vitro* (SIN et al., 2004). Além das DCs, esse agonista de TLR9 provoca a proliferação de linfócitos B, aumenta a atividade citotóxica, induz a produção de IL-12 por macrófagos e IFN- γ por células *natural killers* (NK) (EBNER et al., 1999; WAGNER et al., 1998; WAGNER et al., 2000). A administração de CpG ODNs induz resposta do tipo Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias, além do aumento do títulos de anticorpos, especialmente de imunoglobulinas G 2a (IgG2a) (HARDING et al., 1997; KLINMAN et al., 2009; KRIEG et al., 1998). Em seres humanos, CpG ODNs já foram utilizados em vários ensaios clínicos como adjuvantes em vacinas contra hepatite B (HALPERIN et al., 2003), gripe (KLINMAN et al., 2000) e malária (ELLIS et al., 2009). Os resultados descritos indicam que a inclusão de CpG ODNs nas formulações vacinais melhorou diversos parâmetros da resposta imune e eles constituem o adjuvante da única vacina licenciada contra o antrax (KLINMAN et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente projeto é investigar a influência da sinalização pelos TLRs 3, 5 e 9 na ativação de uma resposta imune específica contra a proteína MSP119 de *P. vivax* quando ela é direcionada para as subpopulações DEC205+CD8+ ou DCIR2+ CD8- de DCs

2.2 Objetivos específicos

- Purificação do anticorpo quimérico anti-DEC-MSP119 , anti-33D1-MSP119 e de seu isotipo controle (Iso-MSP119) à partir do sobrenadante de culturas de células HEK293T transientemente transfectadas com os plasmídeos codificando para as cadeias pesada e leve destes anticorpos;
- Imunização de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para TLR3, TLR5 e TLR9 com duas doses dos anticorpos quiméricos na presença de seus respectivos ligantes (poly(I:C), flagelina ou CpG ODNs);
- Análise da resposta imune celular contra a MSP119 recombinante induzida nos animais selvagens e deficientes para TLR3, TLR5 e TLR9;
- Análise da resposta imune humoral contra a proteína MSP119 recombinante nos diferentes grupos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Camundongos C57BL/6 de ambos os sexos e com idades entre 5-12 semanas foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos durante o curso dos estudos. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 082).

3.2 Plasmídeos e Proteínas Recombinantes

O desenvolvimento e obtenção de todos os plasmídeos utilizados para a expressão das proteínas MSP1₁₉_PADRE, MSP1₁₉, α DEC-MSP1₁₉_PADRE, 33D1-MSP1₁₉_PADRE e Iso-MSP1₁₉_PADRE estão descritos na dissertação de mestrado (ICARO, 2010), bem como a expressão e purificação das proteínas heterólogas.

3.3 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T

Foram utilizadas placas de 150 mm semeadas com $7,5 \times 10^6$ células HEK293T (gentilmente cedidas pelo Dr. Armando Morais Ventura, Departamento de Microbiologia, ICB, USP) em meio DMEM, acrescido de 2 mM L-glutamina, 10 U/mL antibiótico-antimicótico, 1 mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estava em torno de 70%), o meio das placas foi substituído por meio DMEM contendo os aditivos acima, sendo o soro fetal bovino substituído por 1% de nutridoma (Roche). Em seguida, as células foram transfectadas utilizando-se 10 μ g de cada um dos plasmídeos que codificam para as cadeias leve e pesada dos anticorpos anti-DEC205, 33D1 ou Iso em fusão com a proteína MSP1₁₉_PADRE na presença de polietilenimina (0,45 mg/mL, Sigma). Brevemente, os 10 μ g de cada plasmídeo foram dissolvidos em 1 mL de uma solução de 150 mM de NaCl. Após curta agitação, 100 μ L de uma solução de polietilenimina 0,45 mg/mL foram adicionados e a mistura foi submetida a agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 10 minutos à

temperatura ambiente. O volume final de 1,1 mL foi então adicionado a cada placa utilizando-se uma pipeta de 1mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO₂ por 7 dias.

3.4 Precipitação e purificação dos anticorpos híbridos

Passados os 7 dias de incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e centrifugados a 7.500 X g por 20 minutos para precipitação de debris celulares. As proteínas presentes foram então precipitadas adicionando-se (NH₄)₂SO₄ numa relação volume dos sobrenadantes: massa de 60% (ou seja, 1 L de sobrenadante para 600 xg de sulfato de amônio). Os sobrenadantes foram então incubados sob lenta agitação a 4 °C por 16-20 horas. Seguiram-se então mais duas centrifugações a 10.000 xg por 45 minutos para coletar as proteínas precipitadas.

Os precipitados foram ressuspensos em PBS (50 mL para cada 1 L de cultura inicial) e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores para remoção de qualquer partícula não dissolvida. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi então colocado em membranas de diálise (Pierce) e dialisado contra 2 L de PBS gelado (para cada 50 mL de sobrenadante) por 16-20 horas. O volume removido da membrana de diálise foi incubado com esferas de proteína G (Amersham) na proporção de 1 mL de esferas para 50 mL de sobrenadante, sob rotação, a 4 °C por 16-20 horas. A suspensão foi então centrifugada a 800 xg por 5 minutos e as esferas contendo os anticorpos foram adicionadas a colunas de cromatografia (BioRad). Após duas lavagens contendo 5 ml de PBS gelado, a eluição foi realizada em alíquotas de 500 µL utilizando-se tampão glicina 0,1 M, pH 3,0. Para evitar a degradação dos anticorpos devido ao pH ácido, acrescentou-se a cada alíquota 50 µl de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0. A concentração de anticorpos em cada alíquota foi então estimada pelo método de Bradford e as alíquotas mais concentradas foram agrupadas e novamente dialisadas contra PBS gelado.

3.5 Ensaio para detecção de LPS

Para dosagem de LPS nas amostras contendo os anticorpos híbridos, utilizou-se o kit QCL-1000 (Lonza). Brevemente, 5 µg de cada anticorpo quimérico foram diluídos em um volume final de 50 µL de água livre de pirógeno. Em seguida, cada amostra foi incubada a 37 °C. Após estabilização da temperatura, foram adicionados 50 µL de lisado de amebócitos de limulus. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 100 µL de uma solução

cromógena, seguindo incubação por mais 6 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido acético a 25%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nM. Uma curva contendo concentrações conhecidas de LPS (1, 0.5, 0.25 e 0.125 EU/mL) foi utilizada para auxiliar na quantificação de LPS nas amostras testadas.

3.6 Ensaios de imunização com os anticorpos monoclonais híbridos

Grupos de 5-6 animais foram imunizados com 5 µg de cada anticorpo monoclonal híbrido combinados a diferentes adjuvantes. O protocolo de imunização foi realizado com a administração intraperitoneal de duas doses de cada anticorpo quimérico. Os adjuvantes e as doses foram: poly (I:C) InvivoGen[®] (50 µg/animal), CpG ODN 1826 InvivoGen[®] (25 µg/animal), ou flagelina de *Salmonella typhimurium* (FliC) (5 µg/animal) produzida e gentilmente cedida pelo laboratório do professor Luís Carlos de Souza Ferreira (Departamento de Microbiologia, ICB, USP), administrados com 30 dias de intervalo entre cada dose. A análise da resposta imune celular ocorreu entre 45-60 dias após a administração da segunda dose. Para análise da resposta imune humoral, os animais foram sangrados 5 dias antes e 14 dias após a administração da segunda dose.

3.7 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA para a detecção dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foi realizado da seguinte maneira:

3.7.1 Preparo dos Soros

Foi coletado sangue dos camundongos 5 dias antes ou 14 dias após a administração da segunda dose. Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Os soros foram então separados e armazenados em tubos eppendorf de 1,5 mL a -20 °C.

3.7.2 Sensibilização das Placas

Foram utilizadas placas de ELISA (“High binding”, Costar). A cada poço foram adicionados 100 ng da proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* diluída em PBS 1X. As placas foram então deixadas à temperatura ambiente por 16-18 horas e posteriormente lavadas três vezes com a solução de PBS-Tween20 0,02% (PBS-T0,02).

3.7.3 Diluição dos Soros e Reação Imunoenzimática

Cada poço foi então bloqueado com 150 µL de uma solução de bloqueio (PBS-T0,02+ leite 5%+ BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com 100 µL dos soros (diluídos em PBS-T 0,2%+ leite 5%+ BSA 0,25%) em diluições seriadas (fator de diluição 3). O conteúdo dos poços foi desprezado e as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T0,02. O anticorpo secundário contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (Jackson Laboratories) diluído em PBS-T 0,02%+ leite 5%+ BSA 0,25% na proporção de 1:10.000 foi adicionado e incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente (50 µL/poço). Após mais três lavagens com PBS-T 0,02%, cada poço recebeu 100 µL do substrato preparado da seguinte maneira: 10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M (pH 4,7) acrescido de 10 µL de H₂O₂ 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de uma solução de H₂SO₄ 4 N. As placas foram lidas em leitor BioTek ELx800 (Biotek) em comprimento de onda de 490 nM. Os títulos foram calculados como o logaritmo (log₁₀) considerando-se a diluição em que a DO₄₉₀ estivesse maior que 0,1.

3.8 Ensaio de ELISA para detecção das subclasses de imunoglobulinas G

A única modificação feita, em relação a quantificação de IgG total, foi a utilização de anticorpos anti-IgG1, IgG2b, IgG2c ou IgG3 conjugados com peroxidase (Southern Biotech) diluídos 1: 2.000, como anticorpos secundários.

3.9 Ensaio de ELISPOT

Para o ensaio de ELISPOT, utilizou-se o kit “Ready-SET-Go!” (eBioscience) para detecção de IFN-γ e placas de nitrocelulose com 96 poços (MAIPS 4510, Millipore). As placas foram cobertas com 100 µL/ poço de tampão estéril contendo o anticorpo monoclonal anti-IFN-γ de captura diluído 250x. Após incubação em período noturno a 4 °C, a solução

contendo o anticorpo monoclonal de captura foi removida em ambiente estéril e as placas foram então lavadas 3 vezes com tampão estéril. As placas foram bloqueadas pela incubação dos poços com 200 μ L de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por, pelo menos, 2 horas a 37 °C. As células respondedoras foram obtidas dos baços de 2-3 camundongos imunizados com os diferentes anticorpos híbridos ou controles. As hemácias foram lisadas na presença do tampão ACK (EDTA 0,1 mM, NH_4Cl 0,15 mM, KHCO_3 1 mM).

As células foram então lavadas 3 vezes com meio RPMI, ressuspensas em meio RPMI completo [R10, meio RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1 mM, 2-ME 5×10^{-5} M (Sigma), 10% v/v de soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos Gentamicina (40 μ g/ml) e Peflacin (20 μ g/ml)] contendo 30 U/mL de IL-2 humana recombinante e diluídas para uma concentração de 1 a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Cada suspensão contendo 100 μ L de células respondedoras foi pipetada individualmente em cada poço, seguida de mais 100 μ L do antígeno diluído na concentração desejada. As placas foram incubadas em condições estáticas por 18-20 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Depois da incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween20 0,05% (PBS-T0,05). Cada poço recebeu então 100 μ L do anticorpo monoclonal anti-camundongo biotilado diluído 250x em tampão “assay buffer 1x” contido no kit. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente.

Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 3 vezes com PBS-T0,05. Adicionou-se então estreptavidina-peroxidase diluída 250x em “assay buffer 1x” em volume final de 100 μ L/ poço. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e então lavadas 3 vezes com PBS-T0,05 e mais 2 vezes com PBS. As placas foram reveladas adicionando-se 100 μ L/ poço do substrato cromogênico contido no kit AEC (Becton Dickinson) seguindo por mais 45 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi interrompida descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram então secas à temperatura ambiente e os pontos coloridos foram contados em contador automatizado (AID GmbH).

3.10 Marcação intracelular de células produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α

Após o isolamento, as células respondedoras foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^6 células/poço e incubadas com 1 μ g/mL do antígeno, em meio R10 contendo 2 μ g/mL do anticorpo agonista α CD28. Alguns poços foram incubados com 1 μ g/mL de α CD3 como

controle positivo. Após uma hora de incubação, cada poço recebeu 0,5 µL de Golgi Plug (Brefeldina A, BD Pharmingen) e as placas foram incubadas por mais 12-16 horas. Após este período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 xg e os sobrenadantes foram descartados por inversão. Acrescentou-se 150 µL de tampão de FACS (PBS+2% de soro fetal bovino) e as triplicatas foram combinadas em um único poço. Seguiu-se incubação com os seguintes anticorpos para marcação extracelular: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 e anti-CD8-PE-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS no gelo. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com tampão FACS e ressuspensas em 200 µL de PharmingenStain buffer (BD Pharmingen) seguida por mais uma centrifugação, posteriormente adicionando-se 100 µL/poço de Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen). As células foram ressuspensas e incubadas por 15 minutos no gelo. Após esse período, as placas foram centrifugadas e lavadas por 3 vezes com tampão Permash (BD Pharmingen). As células foram então incubadas com os seguintes anticorpos para marcação intracelular: anti-CD3-APC-Cy7, anti-IL2-FITC, anti-TNFα-PE e anti-IFNγ-APC por 45 minutos no gelo. Após mais 3 lavagens com tampão Permash, as células foram ressuspensas em tampão de FACS e lidas no citômetro FACS Canto (BD). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da BD Pharmingen.

3.11 Estratégias para análise de citometria de fluxo

A fim de caracterizar o tipo de resposta celular induzida por cada adjuvante, empregamos o método de citometria de fluxo. Para caracterizar quais populações produziam as citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN-γ e TNFα empregamos o método de marcação intracelular, como descrito no item anterior. A **figura 6** mostra a estratégia de formação de *gates* onde analisamos, usando o software FlowJo[®], separadamente cada população marcada.

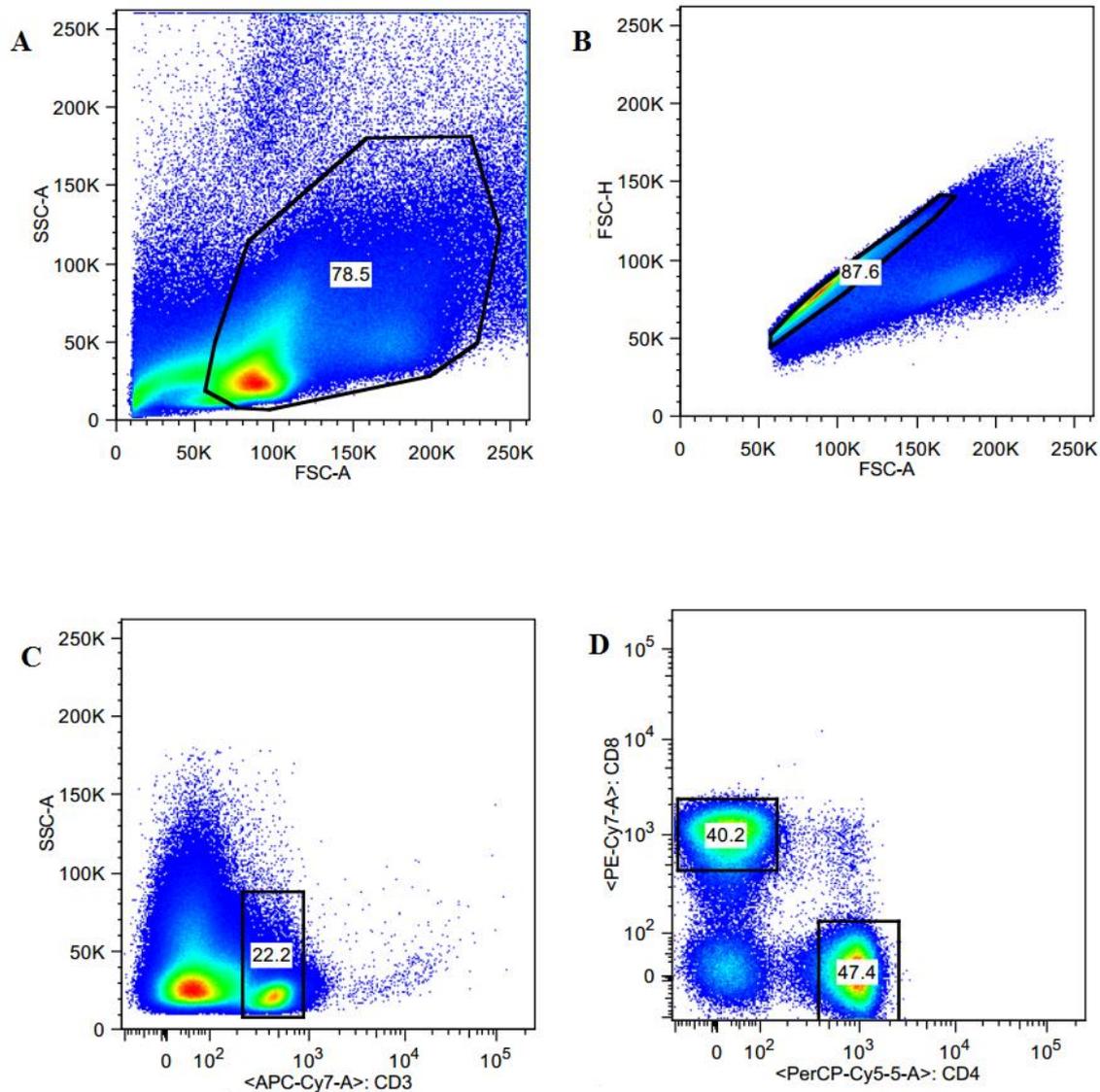


Figura 6 - Estratégia de Análise. Em **A**, o gráfico mostra a relação de granulosidade e tamanho de cada célula. São selecionadas as de tamanho e granulosidade mais comuns em células vivas. Em **B** é feita uma correlação entre a área e tamanho das células, dessa forma podemos eliminar duas ou mais células que foram detectadas pelo aparelho ao mesmo tempo. Já **C** mostra a identificação de células marcadas com anti-CD3, marcador de linfócitos. Em **D** identificamos as células $CD3^+ CD4^+$ que são marcadores presentes em linfócitos T auxiliares.

Para caracterizar e inferir a porcentagem de linfócitos T auxiliares que produzem uma ou mais citocinas pró-inflamatórias, selecionamos apenas as células $CD3^+ CD4^+$ e observamos a presença de células produtoras de citocinas. Este parâmetro tem como controle células que não receberam estímulo *in vitro* com $1\mu\text{g/mL}$ da proteína MSP1₁₉_PADRE. A **figura 7** mostra como foram analisados os dados no software FlowJo®.

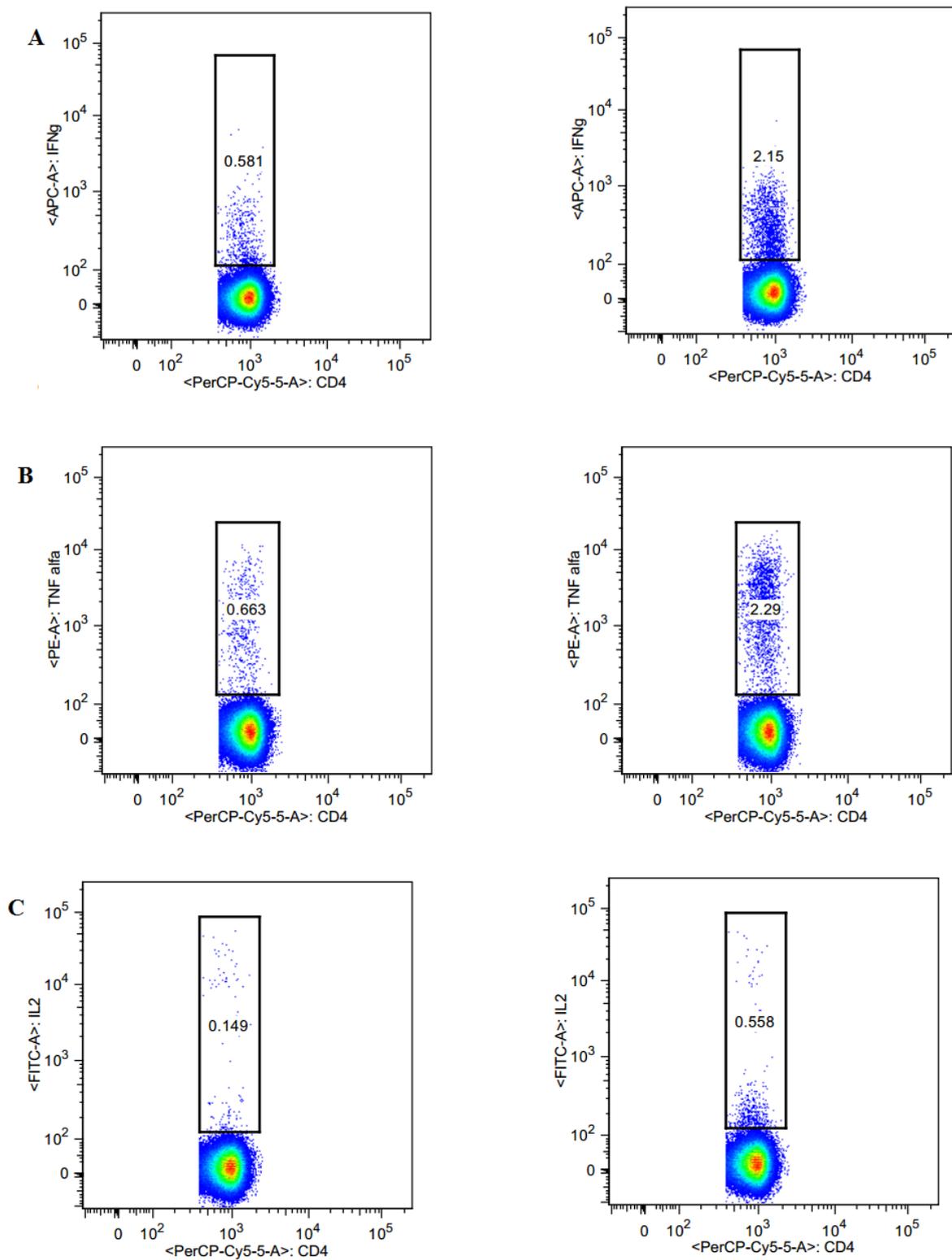


Figura 7 - Comparação de amostras de células estimuladas ou não estimuladas *in vitro* com a proteína recombinante. As populações de células caracterizadas como CD3⁺CD4⁺ são mostradas no gráfico acima. Na primeira coluna, células não estimuladas, ao lado, células estimuladas *in vitro* com 1 µg/mL de MSP19_PADRE. Em A é comparada a produção de IFN-γ, em B a produção de TNFα e em C a produção de IL-2.

3.12 A análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela diluição do corante CFSE

Os baços dos camundongos foram coletados e processados como descrito anteriormente. Após a lise das hemácias e contagem das células, retirou-se o volume correspondente 50×10^6 células e as mesmas foram colocadas em um volume final de 1 mL. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS previamente aquecido a 37 °C contendo o corante CFDA na concentração de final de 1,25 μ M (Vybrant CFDA SE – Cell Tracer Kit, Molecular Probes). As células foram então incubadas a 37 °C por 10 minutos em banho-maria e agitadas a cada 2 minutos para se obter uma marcação homogênea. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1000 xg por 5 minutos e lavadas por 3 vezes com o dobro do volume usado na marcação. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de R10 e contadas novamente.

Cada poço recebeu 3×10^5 células. As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 dias. Após este período, as placas foram centrifugadas, lavadas em tampão FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. A marcação fenotípica foi feita com os seguintes anticorpos: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-PE-Cy7 e anti-CD3-APC-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS e no gelo. As placas foram lavadas por 3 vezes com tampão FACS e as amostras lidas no citômetro FACS Canto.

3.13 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA de uma via seguido do pós teste de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 O CpG ODN tipo B como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs

O CpG ODN tipo B (TCCATGACCGTTCCTGACGTT) é um DNA bacteriano sintético não metilado reconhecido por TLR9, que se localiza nas membranas de endossomos. Além de já ser usado em alguns testes clínicos, é amplamente estudado como adjuvante e apresenta eficácia na geração de respostas de células T CD4⁺ (HARDING et al., 1997).

Animais C57BL/6 selvagens (WT) ou C57BL/6 TLR9 KO foram imunizados com 5 µg das construções quiméricas acrescidas de 25 µg de CpG ODN.

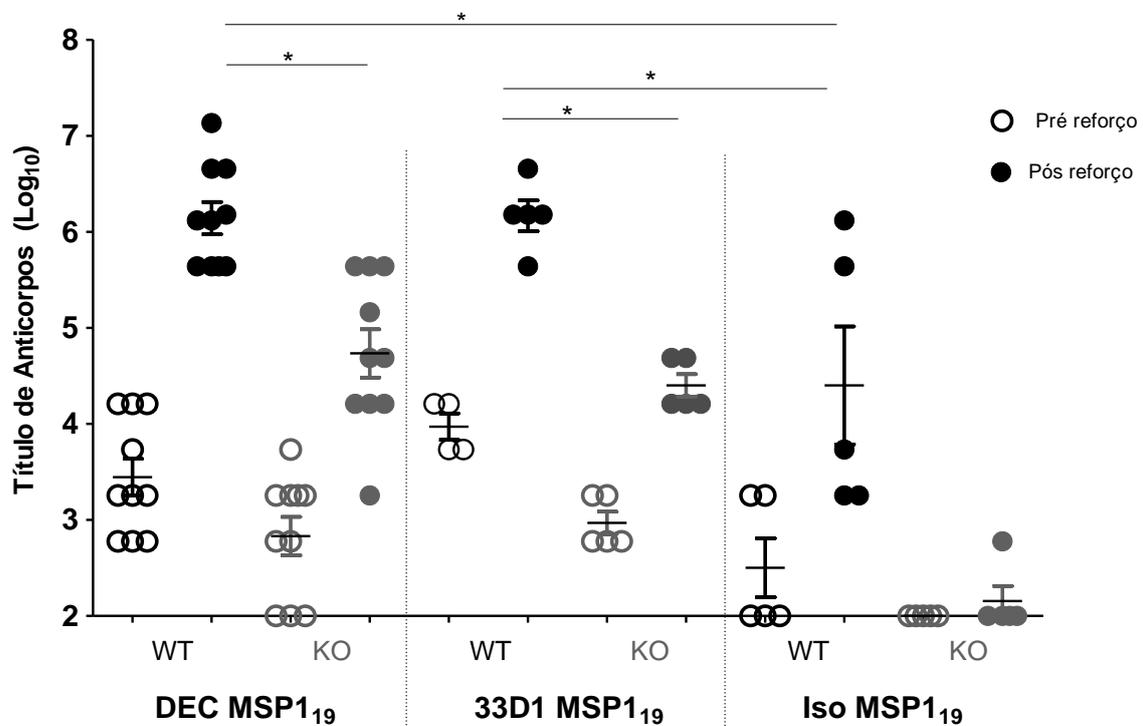


Figura 8 - A produção de anticorpos contra a MSP1₁₉ depende parcialmente da sinalização via TLR9 quando o antígeno é direcionado para as populações de DCs DEC205⁺ ou DCIR2⁺. Grupos de camundongos WT ou TLR9 KO foram imunizados com 5 µg dos anticorpos αDEC-MSP1₁₉_PADRE, 33D1-MSP1₁₉_PADRE ou Iso-MSP1₁₉_PADRE na presença de 25 µg de CpG ODN 1826. Trinta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço nas mesmas condições. A quantidade de imunoglobulinas G (IgG) totais anti-MSP1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. * p < 0,05.

Na **figura 8** podemos observar um aumento significativo do título ($p < 0,05$) de IgG total anti-MSP1₁₉ entre o pré e pós reforço nos grupos imunizados com α DEC-MSP1₁₉_PADRE e 33D1-MSP1₁₉_PADRE tanto nos camundongos WT quanto nos KO. Destacamos a superioridade dos títulos de anticorpos presentes em animais WT ($p < 0,05$). Outro aspecto importante é que o direcionamento para as duas subpopulações de DCs foi capaz de induzir títulos significativamente mais altos de anticorpos anti-MSP1₁₉ do que no grupo onde o antígeno não foi direcionado (Iso-MSP1₁₉). Isto foi observado tanto para camundongos WT quanto KO.

Investigamos a seguir as subclasses de IgGs produzidas pelos animais imunizados (**figura 9**).

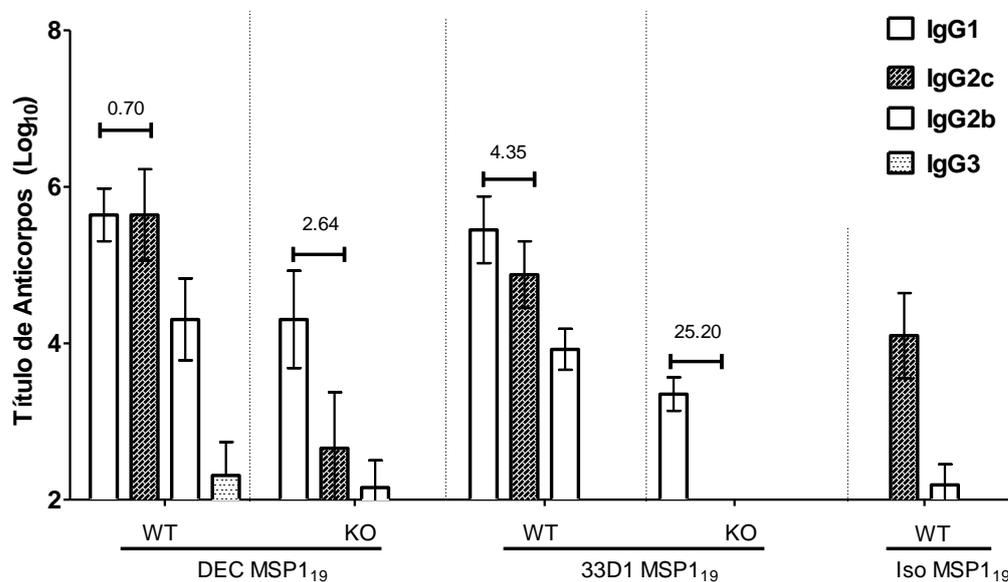


Figura 9 - A imunização com os anticorpos híbridos induz imunoglobulinas G de diferentes subclasses quando na presença de CpG ODN 1826. Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 8. As subclasses de IgGs foram determinadas 15 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log10. Barras brancas mostram o título de IgG1, hachuradas IgG2c, pontilhadas IgG2b e pretas IgG3. As médias \pm desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo. Os números dentro das caixas indicam a proporção IgG1/IgG2c.

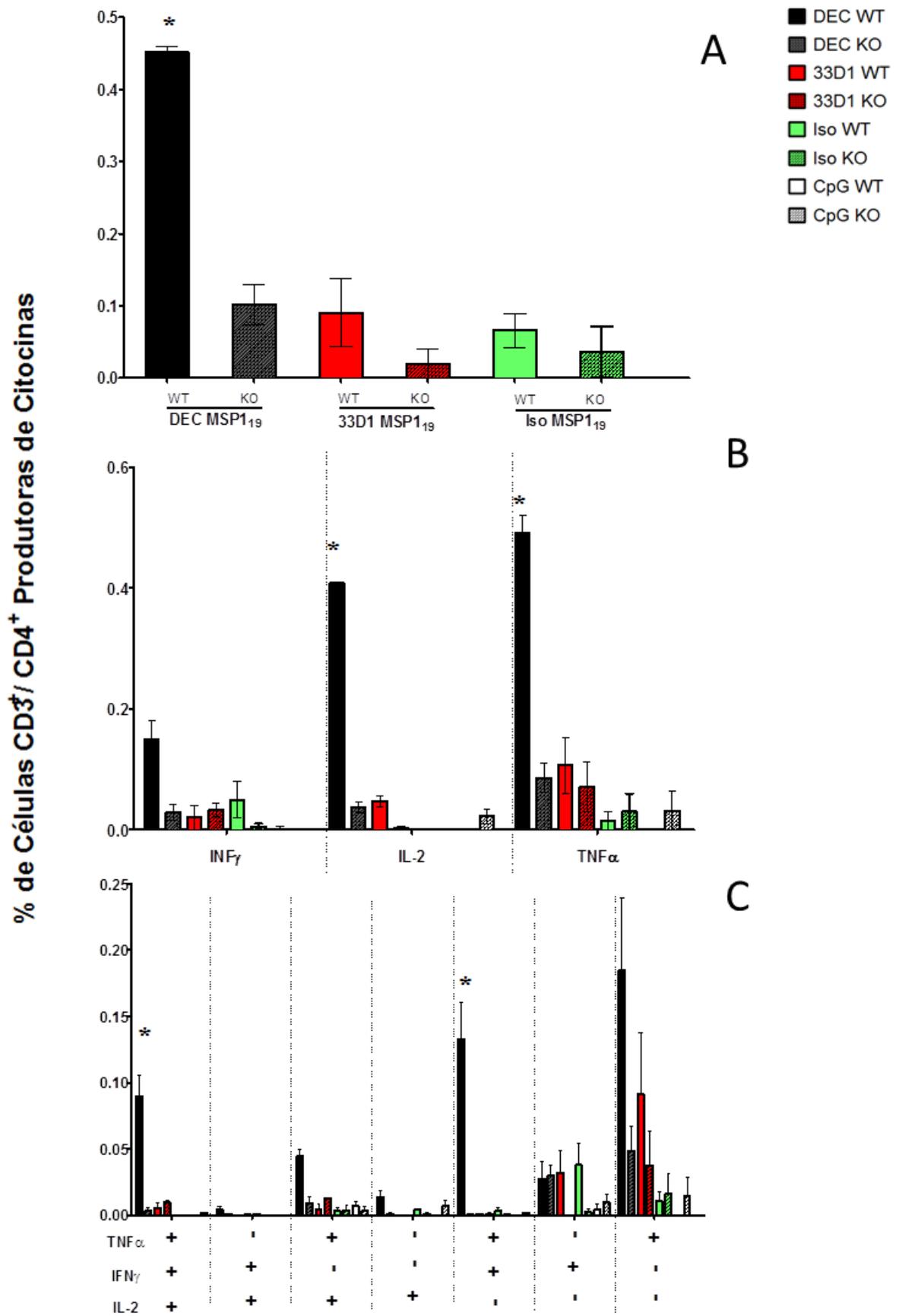
O balanço de subclasses é um parâmetro que auxilia inferir qual é o tipo de perfil de resposta dos linfócitos T auxiliares. Títulos superiores de IgG1 são indicadores de respostas imunológicas com perfil Th2. Já o predomínio de IgG2c indica resposta de perfil Th1. Portanto, quanto maior a razão IgG1/IgG2c, maior será o indício que a resposta é Th2, no contrário, a resposta tende a Th1.

A **figura 9** mostra que a razão IgG1/IgG2c é superior nos animais deficientes em TLR9. Animais C57BL/6 WT imunizados com α DEC-MSP1₁₉_PADRE mais o CpG ODN 1826 apresentaram uma razão de 0,7, enquanto os TLR9 KO 2,64. Semelhantemente, animais C57BL/6 WT imunizados com 33D1-MSP1₁₉_PADRE apresentam razão 4,35, enquanto o grupo correspondente de animais TLR9 KO apresentam razão de 25,20. Isso nos leva a conclusão de que a sinalização via TLR9 pode induzir um perfil de resposta mais Th1. Supreendentemente, os animais C56BL/6 imunizados com a construção quimérica Iso-MSP1₁₉_PADRE mais CpG ODN 1826 apresentaram apenas títulos de IgG2c, os animais TLR9 KO não apresentaram títulos detectáveis.

Um trabalho desenvolvido por Bargieri e colaboradores descreveu a imunização com MSP1₁₉_PADRE usando o adjuvante CpG ODN 1826. Neste estudo, a vacina foi elaborada com a combinação de FliC e CpG ODN 1826 e administrada por via parenteral (BARGIERI et al., 2008). Apesar dessas diferenças, fica evidente o papel desse agonista de TLR9 em aumentar a proporção de IgG2c, corroborando assim com nossos dados aqui apresentados.

O desenvolvimento de uma resposta Th1 foi demonstrado na literatura com outros modelos, como HEL (GOODMAN et al., 1997) e antígenos de superfície do vírus da hepatite B (KRIEG et al., 1998).

Decidimos também fazer a análise da resposta imune celular. Recentemente foi demonstrado para os modelos de *Leishmania major* e *Micobacterium bovis* (HUANG et al., 2007; WAGNER et al., 2008) que uma resposta protetora contra estes patógenos correlaciona-se com a indução de células polifuncionais produtoras simultâneas de IFN- γ , TNF α e IL-2. Por este motivo elegemos essas três citocinas para nossas análises. Realizamos então a análise da ativação de células CD3⁺CD4⁺ positivas, que correspondem aos linfócitos T auxiliares. Conforme descrito em material e métodos, esplenócitos provenientes de animais imunizados foram reestimulados *in vitro* com 1 μ g/mL da proteína MSP1₁₉_PADRE. Em seguida, empregando o método de marcação intracelular, inferimos a porcentagem de linfócitos T produtores de citocinas pró-inflamatórias (**figura 10**).



Os dados nos permitem inferir que o emprego do α DEC como carreador do antígeno MSP1₁₉_PADRE na presença de CpG ODN promove uma resposta celular superior àquela induzida pelo direcionamento deste antígeno para a população de DCs 33D1⁺. Destacamos na **figura 10C** uma maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ produtores somente de TNF α , ou de IFN- γ e TNF α , ou ainda uma população produtora das três citocinas simultaneamente. Além dessas constatações, observamos o papel importante do receptor TLR9 nesse modelo. Os grupos TLR9 KO imunizados com α DEC-MSP1₁₉_PADRE apresentaram uma resposta significativamente inferior àquela induzida nos animais WT (barras pretas com barras pretas hachuradas). Já nos animais WT imunizados com o anticorpo 33D1-MSP1₁₉_PADRE, esta resposta foi, em geral, inferior à induzida com α DEC-MSP1₁₉_PADRE. Interessantemente, não observamos uma diferença significativa nos animais imunizados com 33D1-MSP1₁₉_PADRE ou Iso-MSP1₁₉_PADRE na ausência ou presença do receptor TLR9. Uma vez caracterizada a resposta humoral e a produção de citocinas por células T CD4⁺, avaliamos também a capacidade proliferativa dessas células, de acordo com a metodologia anteriormente descrita (**figura 11**).

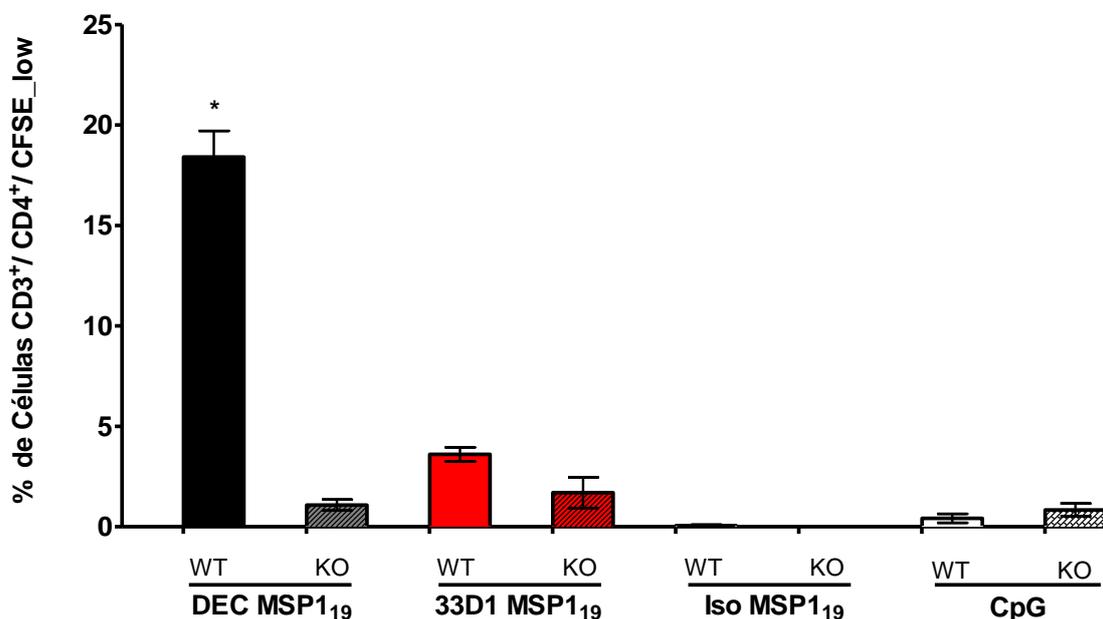


Figura 11 - A sinalização via TLR9 favorece a proliferação de linfócitos T CD4⁺ quando o antígeno é direcionado via α DEC205. Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 8. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação através da diluição do corante CFSE 20 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL da proteína recombinante MSP1₁₉_PADRE. O gráfico mostra a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow) (* p < 0,05).

A **figura 11** mostra que, assim como nos resultados anteriores, o direcionamento para a subpopulação de DCs DEC205⁺CD8 α ⁺ foi mais eficaz também para a indução de células capazes de proliferar quando reestimuladas com o antígeno MSP1₁₉_PADRE. Outros trabalhos também mostram a influência do CpG ODN em estimular uma resposta proliferativa. Um modelo vacinal desenvolvido por Good e colaboradores, baseado em baixas concentrações de *P. chabaudi* mortos, teve um aumento significativo da proliferação de células T CD3⁺CD4⁺ quando o CpG ODN foi acrescido a formulação (GOOD et al., 2010).

4.2 Flagelina FliC de *Salmonella typhimurium* como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs

A flagelina é uma proteína presente na estrutura dos flagelos de bactérias como a *Salmonella typhimurium*. Essa proteína, por ser reconhecida por TLR5 e NLCR4, é um potente estimulador da resposta imune. Diversas estratégias foram usadas utilizando-a como adjuvante ou fusionando-a a antígenos recombinantes de interesse (HUANG et al., 2007).

Animais C57BL/6 WT ou C57BL/6 TLR5 KO foram imunizados com 5 μ g das construções quiméricas acrescidas de 5 μ g de flagelina

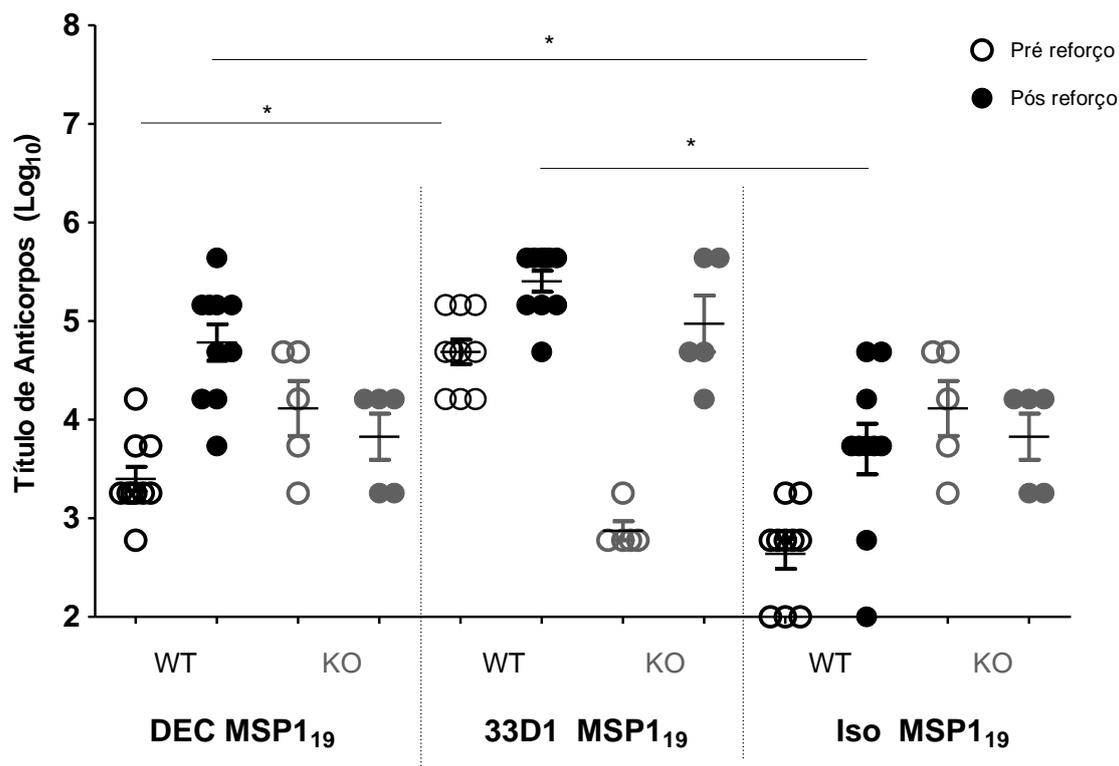


Figura 12 - A administração de 33D1-MSP1₁₉_PADRE na presença de flagelina induziu resposta humoral diferente da resposta induzida pelo α DEC-MSP1₁₉_PADRE no pré-reforço em animais WT. Grupos de camundongos WT ou TLR5 KO foram imunizados com 5 μ g dos anticorpos α DEC-MSP1₁₉_PADRE, 33D1-MSP1₁₉_PADRE ou Iso-MSP1₁₉_PADRE na presença de 5 μ g de flagelina. Trinta dias depois após da administração da primeira dose, os animais receberam um reforço nas mesmas condições. A quantidade de anticorpos anti-MSP1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo \pm desvio padrão. * p < 0,05.

A **figura 12** mostra uma clara evidência de que o uso do 33D1-MSP1₁₉_PADRE em presença de FliC deflagra uma resposta humoral mais alta com apenas uma dose nos animais WT. O título de anticorpos alcançado após 25 dias foi superior ao induzido por α DEC-MSP1₁₉_PADRE e Iso-MSP1₁₉_PADRE. Esse efeito foi dependente da sinalização pelo TLR5, pois na ausência do mesmo, a resposta foi significativamente mais baixa. É também possível observar que o direcionamento de antígenos aumenta a produção de anticorpos específicos, quando comparado aos títulos obtidos com a imunização usando o isotipo controle. Para obter mais informações a respeito da resposta humoral, foram dosados os anticorpos específicos de cada subclasse, apresentados na **figura 13**.

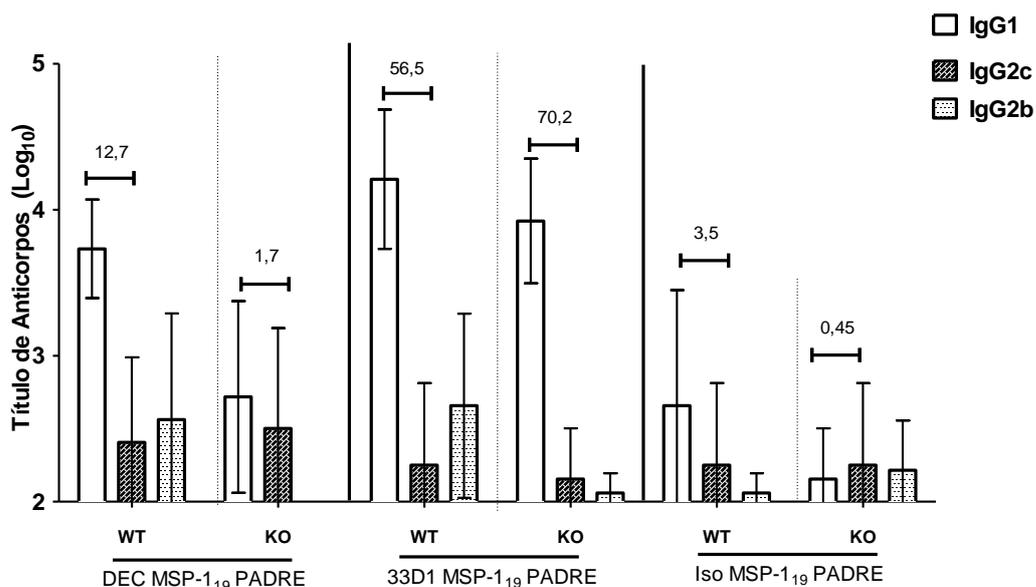


Figura 13 - A imunização com os anticorpos híbridos na presença de flagelina não induz a produção de IgG3 e leva a uma resposta mais direcionada para um padrão Th2. A titulação das subclasses de IgGs foi realizada 15 dias após a administração da dose de reforço. A razão IgG1/IgG2c foi obtida a partir da divisão dos títulos desses anticorpos. As barras indicam o título de anticorpos inferidos em cada um dos grupos. Barras brancas mostram o título de IgG1, hachuradas IgG2c, pontilhadas IgG2b. A amostra não apresentou títulos de IgG3 detectáveis.

O emprego da flagelina parece privilegiar a resposta Th2. Observamos que, com exceção dos camundongo TLR5 KO imunizados com Iso-MSP1₁₉_PADRE, todos os outros grupos apresentaram títulos superiores de IgG1. Quando comparamos animais C57BL/6 WT com os animais TLR5 KO no direcionamento para o receptor DEC205, observamos maior razão no grupo selvagem (17,2) que no grupo deficiente (1,7). Assim, podemos afirmar que o direcionamento para esse receptor, concomitante com a administração do agonista de TLR5, induziu uma resposta Th2. Observamos o oposto, quando o direcionamento é via 33D1 para o receptor endocítico DCIR2. A ativação do TLR5 parece diminuir a razão IgG1/IgG2c, nos animais C57BL/6 WT (56,5) quando comparado ao grupo TLR5 deficiente (70,2). É importante ressaltar que a subpopulação de DCs DCIR2⁺ é sensível à agonistas de TLR5, enquanto a subpopulação DEC205⁺ não é. Isso pode explicar o motivo dos efeitos diferentes em cada direcionamento. Quando comparamos o direcionamento de antígenos com o isotipo controle, observamos que parece favorecer a resposta Th1 quando comparado ao direcionamento. Ainda, a ausência de sinalização pelo TLR5 parece diminuir ainda mais a razão IgG1/IgG2c.

BARGIERI e colaboradores obtiveram resultados semelhantes quando direcionaram o mesmo antígeno e utilizando como adjuvante a flagelina. Houve grande predomínio da

produção de IgG1 específica. Esses dados corroboram os aqui apresentados. O diferencial de nossos estudos é que a imunização que emprega a construção isotópica parece reverter essa influência, diminuindo a proporção IgG1/IgG2c. Essa diferença é ainda mais acentuada nos animais TLR5 KO.

A **figura 14** mostra que o direcionamento da proteína MSP1₁₉_PADRE através do receptor DEC205 levou a indução de maior porcentagem de células produtoras das três citocinas analisadas.

Como vemos na **figura 14A e 14B**, o direcionamento do antígeno para o receptor DEC205, tanto nos animais WT quanto nos TLR5 KO, foi superior em induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias quando comparado aos demais grupos. A **figura 14C** mostra que o direcionamento para o receptor DEC205 induziu uma maior porcentagem de células produtoras simultaneamente das citocinas pró-inflamatórias analisadas.

É notável a superioridade da subpopulação de DCs DEC205⁺CD8α⁺ em ativar a resposta de células T CD4⁺. Observamos também que a resposta celular não depende exclusivamente da sinalização via TLR5. Isso é explicável, uma vez que a flagelina ativa o complexo inflamossomo também por NLCR4 (AKIRA et al., 2009). Podemos concluir que o emprego do αDEC-MSP1₁₉_PADRE na presença de flagelina é superior na indução da produção das três citocinas, e foi mais eficiente em induzir o desenvolvimento de células multifuncionais. Uma vez que observamos a resposta humoral e de produção de citocinas, avaliamos também a capacidade proliferativa dos linfócitos T CD4⁺.

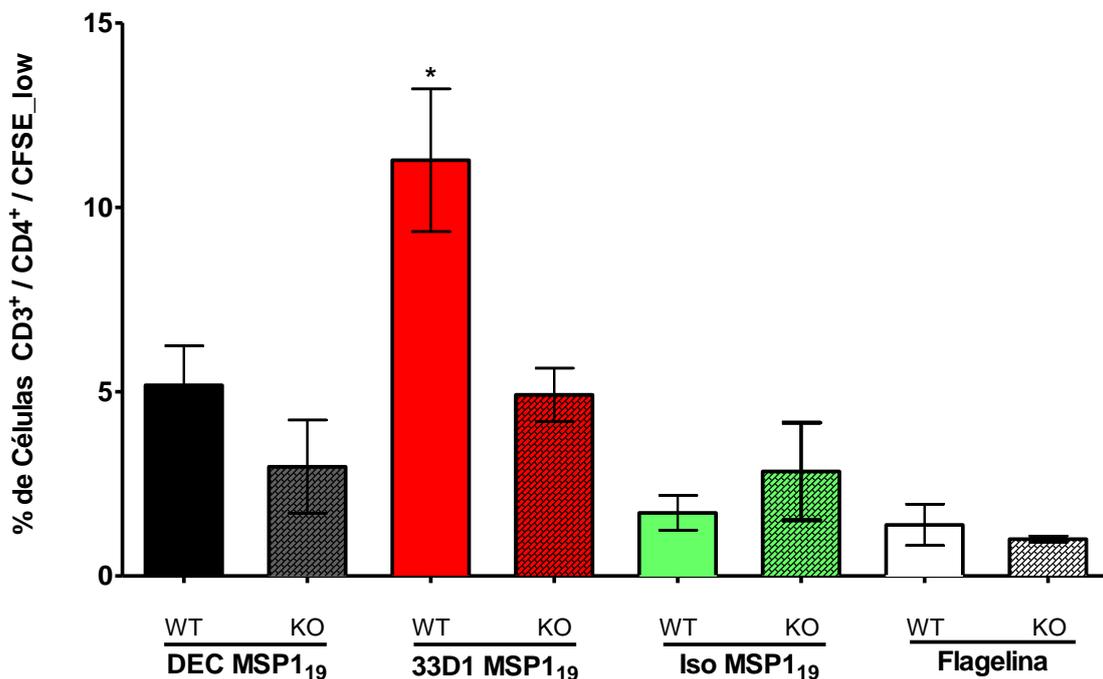


Figura 15 - O emprego da flagelina favorece a proliferação de linfócitos T CD4⁺ no direcionamento de antígenos via 33D1. Grupos de camundongos WT ou TLR5 KO foram imunizados como descrito na figura 12. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE 20 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1µg/mL da proteína recombinante MSP1₁₉_PADRE. O gráfico mostra a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSE_{low}). * p < 0,05.

Consoante com a resposta humoral, mas não com a avaliação da produção de citocinas, o direcionamento para DCIR2 via o anticorpo 33D1 foi mais eficiente para induzir linfócitos T CD4⁺ capazes de proliferar frente ao um reestímulo com a proteína MSP1₁₉_PADRE (**figura 15**). E esta resposta parece ser parcialmente dependente da sinalização via TLR5. Uma hipótese a ser considerada é que a subpopulação de DCs DCIR2⁺CD8α⁻ fica mais sensível à flagelina, uma vez que esta apresenta em sua superfície um maior número de receptores de TLR5.

Diversos trabalhos descreveram o papel adjuvante da flagelina em diferentes modelos. Bargieri colaboradores empregaram o mesmo antígeno e adjuvante aqui descritos, porém, sem do direcionamento. Neste estudo foi observado um discreto aumento da produção de IFN-γ quando na presença de flagelina. O principal resultado é administração concomitante de dois adjuvantes: CpG ODN e flagelina. Nosso modelo aqui descrito mostra a influência do direcionamento na melhora da ativação da resposta celular. Além de uma relevante porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ produtoras de IFN-γ, obtivemos também células produtoras de IL-2 e TNFα.

4.3 Poly I:C como adjuvante no direcionamento de antígenos para DCs

O poly I:C é um RNA dupla fita sintético e reconhecido por TLR3. Alguns trabalhos mostram sua capacidade de induzir uma resposta de linfócitos T multifuncionais (HUANG et al., 2008). Animais C57BL/6 WT ou C57BL/6 TLR3 KO foram imunizados com 5 µg dos anticorpos αDEC-MSP1₁₉_PADRE ou Iso-MSP1₁₉_PADRE acrescidas de 50 µg de poly I:C.

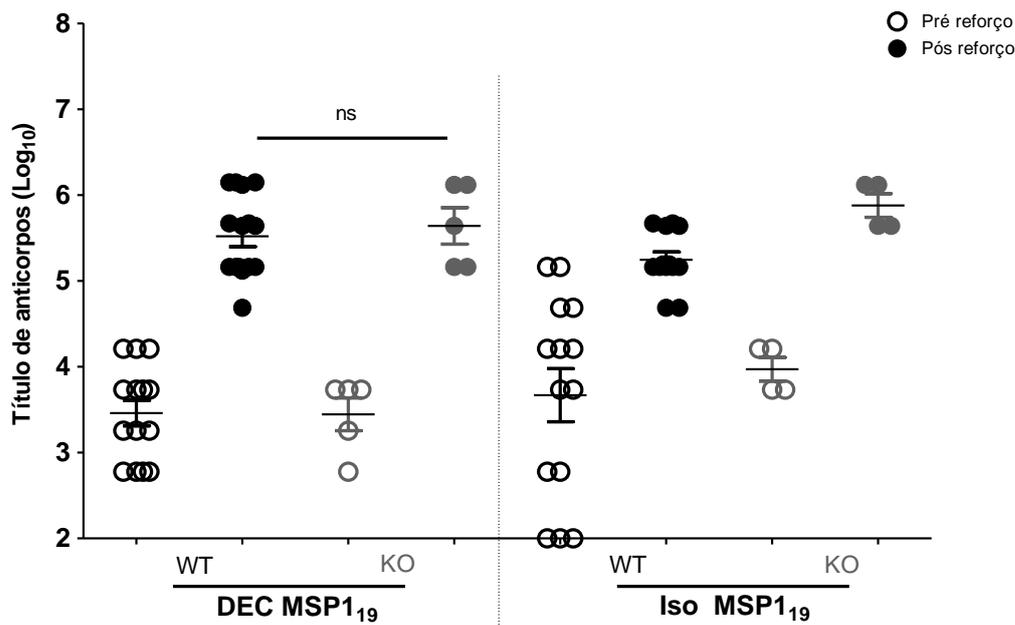
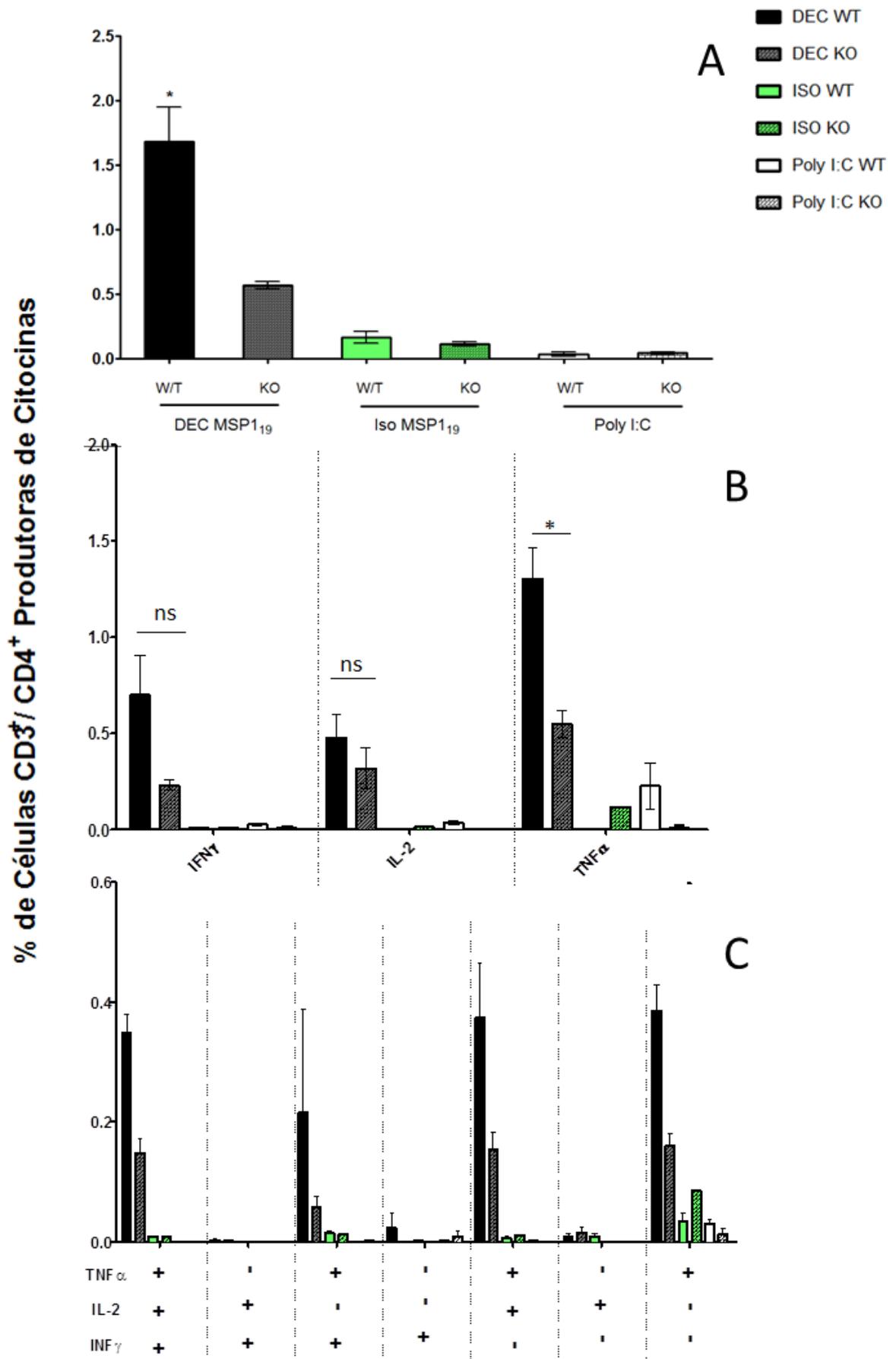


Figura 16 - Produção de IgG total contra MSP1₁₉ induzida por poly I:C foi semelhante em todos os grupos. Grupos de camundongos WT ou TLR3 KO foram imunizados com 5 µg dos anticorpos anti-DEC MSP1₁₉_PADRE, 33D1 MSP1₁₉_PADRE ou Iso MSP1₁₉_PADRE na presença de 50 µg de poly I:C. Trinta dias depois após da administração da primeira dose, os animais receberam um reforço nas mesmas condições. A quantidade de anticorpos anti-MSP1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. ns = não significativo.

A **figura 16** mostra a resposta imune humoral anti-MSP1₁₉ induzida nos grupos imunizados com αDEC-MSP1₁₉_PADRE ou Iso-MSP1₁₉_PADRE. Não encontramos diferenças significativas com o uso desse agonista de TLR3, tanto na presença quanto na ausência do direcionamento, como também na comparação de grupos WT com os TLR3 KO. Esses dados apontam para um importante papel do receptor MDA5 na ativação da resposta humoral.

Em estudos realizados por Boscardin e colaboradores foram detectados altos títulos de anticorpos anti-CS no soro dos animais imunizados após a administração de uma dose de reforço empregando o direcionamento de antígenos acrescido de αCD40+poly I:C (BOSCARDIN et al., 2006). Semelhantemente, obtivemos altos títulos de anticorpos específicos contra MSP1₁₉, porém o direcionamento não pareceu tão relevante, já que direcionamento para DEC205 ou o uso do isotipo controle não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Uma explicação para esse fenômeno pode ser a alta imunogenicidade do epítipo PADRE.



Na **figura 17A** observa-se a superioridade na produção geral de qualquer uma das citocinas nos animais WT imunizados com α DEC-MSP₁₉_PADRE em comparação com os animais KO. A resposta induzida nos animais imunizados com o isotipo controle foi bastante baixa tanto nos WT quanto nos KO. No entanto, quando comparamos a produção individual de cada citocina (**figura 17B**), notamos que somente a produção de TNF α é superior nos animais WT imunizados com α DEC-MSP₁₉_PADRE. As outras duas citocinas (IL-2 e IFN- γ) possuem diferenças não significativas. Porém, quando fomos comparar a produção concomitante de mais de uma citocina, percebemos que o direcionamento do antígeno para a subpopulação de DCs DEC205⁺CD8 α ⁺ induz mais células polifuncionais do que a ausência do direcionamento. É importante ter em mente, no entanto, que a ausência do TLR3 diminui a ativação das células T mas não a abole completamente. Este dado é interessante porque mostra o papel da sinalização via receptor MDA5.

Nossos resultados são consoantes aos descritos pela literatura. Trumfheller e colaboradores administraram duas doses do anticorpo anti-DEC-GAG na presença somente de poly (I:C). Os resultados mostraram a indução uma resposta de linfócitos T CD4⁺ polifuncional (com produção simultânea de IL-2, IFN- γ e TNF α) bastante duradoura e também protetora (TRUMPFHELLER et al., 2008). Isso reforça a relevância do estudo desse modelo como um potencial candidato pra formulações de vacina contra malária.

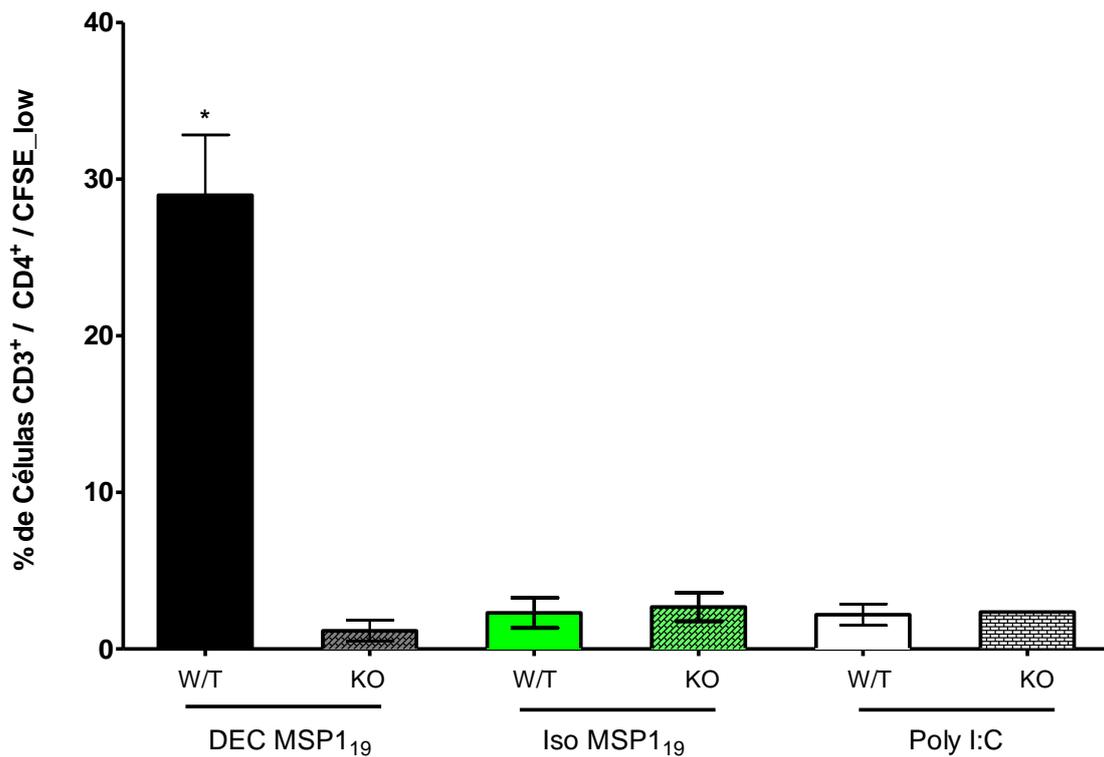


Figura 18 - O emprego de poly I:C favorece a proliferação de linfócitos T CD4⁺ no direcionamento de antígenos via α DEC205. Grupos de camundongos W/T ou TLR3 KO foram imunizados como descrito na figura 16. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE 20 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 μ g/mL da proteína recombinante MSP1₁₉_PADRE. O gráfico mostra a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSE_{low}). * p < 0,05.

Quando avaliamos a proliferação das células T CD4⁺ (**figura 18**), percebemos que o direcionamento é superior ao não direcionamento e que neste caso parece haver uma maior influência da sinalização via TLR3.

Consoante com outros trabalhos na literatura, que estudaram outros antígenos como OVA, CSP ou gag-p24, o emprego deste adjuvante privilegiou a ativação da resposta imunológica quando o direcionamento é feito para o receptor endocítico DEC205 (TAN et al., 2013). Uma vez que observamos a superioridade de proliferação celular em outros grupos do mesmo experimento.

5 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o direcionamento do antígeno MSP1₁₉_PADRE por meio do anticorpo α DEC é o mais eficiente em desenvolver respostas multifuncionais, uma vez que a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ é consistentemente superior em todos os modelos aqui descritos. Observamos também algumas evidências que apontam a importância da expressão diferenciada de TLRs nas duas subpopulações de DCs. Nos experimentos usando flagelina, o direcionamento de antígenos para a subpopulação DCIR2⁺CD8 α ⁻, que expressa o TLR5, foi mais eficaz em produzir uma resposta humoral e proliferação celular, porém, a produção de citocinas é melhor desenvolvida quando o direcionamento de antígenos é feito para o DEC205.

Por meio do uso de animais KO, obtivemos evidências da possível ação de outros receptores dos inflamossomos no nosso modelo de direcionamento de antígenos, uma vez que a resposta humoral dos animais TLRs KO imunizados com a flagelina ou poly I:C apresentou títulos de IgG total muito semelhantes aos animais WT.

REFERÊNCIAS*

- AGRAWAL, S. et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. **J. Immunol.**, v. 171, n. 10, p. 4984-4989, 2003.
- AIDA, Y.; PABST, M. J. Priming of neutrophils by lipopolysaccharide for enhanced release of superoxide. Requirement for plasma but not for tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, v. 145, n. 9, p. 3017-3025, 1990.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732-738. 2001.
- ALLAN, R. S. et al. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1925-1928, 2003.
- ANDRADE, B. B. et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, n.13, 2010. DOI: 10.1186/1475-2875-9-13. 2010.
- AVRIL, T. et al. Not all polyriboinosinic-polyribocytidylic acids (Poly I:C) are equivalent for inducing maturation of dendritic cells: implication for alpha-type-1 polarized DCs. **J. Immunother.**, v. 32, n. 4, p. 353-362, 2009.
- BALAZS, M. et al. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. **Immunity**, v. 17, p. 341-352, 2002.
- BARBALAT, R. et al. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. **Nat. Immunol.**, v. 10, n.11, p. 1200-1207, 2009.
- BARGIERI, D. Y. et al. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella typhimurium. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2818-2826, 2010.
- BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132-6142, 2008.
- BATES, J. T. et al. Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. **J. Immunol.**, v. 182, n. 12, p. 7539-7547, 2009.
- BOHLE, B. et al. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 2344-2453, 1999.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BONIFAZ, L. et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 12, p. 1627-1638, 2002.

BONIFAZ, L. C. et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 6, p. 815-824, 2004.

BONIFAZ, L. et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 12, p. 1627-1638, 2002.

BONIFAZ, L. C. et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 815-824, 2004.

BOSCARDIN, S. B. et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits longlived T cell help for antibody responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 599-606, 2006.

BOSCARDIN, S. B. et al. Vaccines based on dendritic cell biology. In: LEVINE, M. M. (Ed.). **New generation vaccines**. New York: Informa Healthcare, 2010. p. 327-339.

BOSCARDIN, S. B. et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 599-606, 2006.

BOWIE, A. G. Insights from vaccinia virus into Toll-like receptor signalling proteins and their regulation by ubiquitin: role of IRAK-2. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 36, n. 3, p. 449-452, 2008.

BOZZACCO, L. et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8⁺ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, n. 4, p. 1289-1294, 2007.

BRAGA, C. J. et al. CD8⁺ T cell adjuvant effects of Salmonella FliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1373-1382, 2010.

CASARES S. et al. The RTS, S malaria vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 4880-4894. 2010.

CHAUNG, I. et al. DNA Prime/Adenovirus Boost Malaria Vaccine Encoding P. falciparum CSP and AMA1 Induces Sterile Protection Associated with Cell-Mediated Immunity Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. doi: 10.1371/journal.pone.0055571. 2013

CHU, R. S. et al. CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 1623-1631, 1997.

CHUAI, X. et al. Poly(I:C)/alum mixed adjuvant priming enhances HBV subunit vaccine-induced immunity in mice when combined with recombinant adenoviral-based HBV vaccine boosting. **PLoS One**, v. 1, 2013.

CIACCI-WOOLWINE, F. et al. Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 3, p. 1127-1134, 1998.

CUNHA, M. G. et al. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 385-396, 2001.

DALOD, M. et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 195, n.4, p. 517-528, 2002.

DAVIS, H. L. et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **J. Immunol.**, v. 160, p. 870-876, 1998.

DE BEAUDRAP, P. et al. Impact of malaria during pregnancy on pregnancy outcomes in a Ugandan prospective cohort with intensivemalaria screening and prompt treatment. **Malaria Journal**, v. 12, p. 139. 2013. doi: 10.1186/1475-2875-12-139.

DEN HAAN, J. M. et al. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 12, p. 1685-1696, 2000.

DEN HAAN, J. M.; BEVAN, M. J. Constitutive versus activation-dependent crosspresentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 6, p. 817-827, 2002.

DIDIERLAURENT, A. et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J. Immunol.**, v. 172, n. 11, p. 6922-6930, 2004.

DUDZIAK, D. et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v.315, n. 5808, p. 107-111, 2007.

EDWARDS, A. D. et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. **J. Immunol.**, v. 169, n.7, p. 3652-3560, 2002.

EDWARDS, A. D. et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 4, p. 827-833, 2003.

ELLIS, R. D. et al. A Phase 1 study of the blood-stage malaria vaccine candidate AMA1-C1/Alhydrogel with CPG 7909, using two different formulations and dosing intervals. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4104-4109, 2009.

FRANCHI, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 576-582, 2006.

GRAVES, P.; GELBAND, H. Vaccines for preventing malaria (blood-stage). **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 4, 2006.

GURER, C. et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1231-1239. 2008.

HALPERIN, S. A. et al. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2461-2467, 2003.

HANSEN, S. G. et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. **Nat. Med.**, v. 15, p. 293-299. 2009.

HAWIGER, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 194, n.6, p. 769-779. 2001.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103, 2001.

HERRERA, S. et al. Efficiency of human Plasmodium falciparum malaria vaccine candidates in Aotus lemurinus monkeys. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 87. p. 423-428, 1992. Suplemento.3.

HONKO, A. N. et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1113-1120, 2006.

HULEATT, J. W. et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 201-214, 2008.

HULEATT, J. W. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v. 25, n. 4, p. 763-775, 2007.

INABA, K. et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 180, n.5, p. 1849-1860, 1994.

INABA, K. S. et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 6, p. 927-936, 2000.

IYODA, T. et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 10, p. 1289-1302, 2002.

JACOBS, B. L.; LANGLAND, J. O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. **Virology**, v. 219, n. 2, p. 339-349, 1996.

JIANG, W. W. et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. **Nature**, v. 375, n. 6527, p. 151-155, 1995.

JORDAN, M. et al. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, n. 4, p. 596-601, 1996.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, n. 5, p. 979-987, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 131-137, 2006.

KIM, T. et al. CpG-ODN-stimulated dendritic cells act as a potent adjuvant for E7 protein delivery to induce antigen-specific antitumour immunity in a HPV 16 E7-associated animal tumour model. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 117–125, 2004. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01851.x

KLINMAN, D. M. et al. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 61, n. 3, p. 248-255, 2009.

KLINMAN, D. M. et al. CpG oligonucleotides improve the protective immune response induced by the licensed anthrax vaccine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1082, p. 137-150, 2006.

KRETSCHMER, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1219-1227, 2005.

KREUTZ, M. et al. Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0040208.

KUMAGAI Y. et al. Pathogen recognition by innate receptors. **J. Infect. Chemother.**, v. 14, p. 86-92, 2008.

KUMAR, H. et al. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 388, p. 621-625, 2009.

LAHOUD M. H. et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, n. 40, p. 16270–16275, 2012.

LAHOUD M. H. et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, p. 16270–16275, 2012.

LIU, K. et al. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 8, p. 1091-1097, 2002.

MAHNKE, K. et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **J. Cell. Biol.**, v. 151, n. 3, p. 673-684, 2000.

MATSUMOTO, M.; SEYA, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 60, n. 7, p. 805-812, 2008.

MCDONALD, W. F. et al. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. **J. Infect Dis.**, v. 195, n. 11, p. 1607-1617, 2007.

MEANS, T. K. et al. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 170, n. 10, p. 5165-5175, 2003.

NCHINDA, G. et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1427-1436, 2008.

POMBO, D.J. et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v. 360, p. 610–617, 2002.

POOLEY, J. L. et al. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 166, n. 9, p. 5327-5330, 2001.

RIBEIRO, S. P. et al. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. 11072, 2010.

RILEY, E.M. et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. **Parasite Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 321-337, 1992.

ROBINSON, R. A. et al. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosicpolyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 57, n. 3, p. 599-602, 1976.

ROESTENBERG, M. et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **N. Engl. J. Med.** v. 361, p. 468–477, 2009.

ROMAN, M. et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. **Nat. Med.**, v. 3, p. 849–854, 1997.

ROSA D.S. et al. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol. Lett.**, v. 92, n. 3, p. 259-268, 2004.

ROSA, D.S. et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4⁺ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes. Infect.**, v. 8, n. 8, p. 2130-2137, 2006.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

SCHEINECKER, C. et al. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 8, p. 1079-1090, 2002.

SCHNORRER, P. et al. The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in crosspresentation is not dictated by antigen capture. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 28, p. 10729-10734, 2006.

SEDER, R. A. et al. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. **Nat. Rev. Immunology**, v. 8, p. 247-258. 2010.

SHARMA, S.; PATHAK, S. Malaria vaccine: a current perspective. **J. Vector Borne Dis.**, v. 45, n. 1, p. 1-20, 2008.

SMITH, K. D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 12, p. 1247-1253, 2003.

SPARWASSER, T. et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2045–2054, 1998.

SPEISER, D. E. et al. Rapid and strong human CD8⁺ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 3, p. 739–746, 2005.

STAHL-HENNIG, C. et al. Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 4, 1000373, 2009.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 319-324, 2008.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 319-324, 2008.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, n. 5, p. 1142-1162, 1973.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 373-381, 2006.

TACKEN, P. J. et al. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 790-802, 2007.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 3-9. 2004.

TRUMPFHELLER, C. et al. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 607-617, 2006.

TRUMPFHELLER, C. et al. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 607-617, 2006.

TRUMPFHELLER, C. et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 7, p. 2574-2579, 2008.

TSUJI, T. et al. Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses with broad antigen specificity. **J. Immunol.**, v. 186, n. 2, p. 1218-1227, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1000808. 2011.

VALDERRAMA-AGUIRRE, A. et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV2001: a potential malaria vaccine subunit. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 5, p. 16-24, 2005.

VILLADANGOS, J. A.; YOUNG, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 352-361, 2008.

WAGNER, H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. **Trends. Immunol.**, v. 25, n. 7, p. 381-386, 2004.

WANG, Y. et al. DNA vaccine encoding CD40 targeted to dendritic cells in situ prevents the development of Heymann nephritis in rats. **Kidney Int.**, v. 83, n.2, p. 223-232, 2013. DOI: 10.1038/ki.2012.374. 2013.

WEST, A. P. et al. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 22, p. 409-437, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>. Acesso em: 01 out. 2013.

YANG, K. et al. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN α /beta and -lambda Is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 465-478, 2005.